

Nurmisäilörehun valkuaisen metaboliareittien mallintaminen lypsylehmän pötsissä dynaamisen mallin avulla.

Mikko Anttila
Pro gradu -tutkielma
Kotieläintieteen laitos
Joulukuu 2007

Sisällys

1. Johdanto.....	1
2. Aineisto ja menetelmät.....	8
2.1 Koeasetelma ja koe-eläimet	8
2.2 Koerehujen kasvatus ja ¹⁵ N merkatun säilörehun valmistus.....	9
2.3 Näytteiden otto ja analysointi.....	10
2.3.1 Koerehujen näytteet	10
2.3.2 Pötsin ruokasulanäytteet	11
2.4 Kemialliset analyysit	15
2.5 Tulosten laskenta	16
3. Tulokset.....	20
3.1 Rehujen kemiallinen koostumus	20
3.2 Syönti, dieetin sulavuus ja maidontuotanto	22
3.3 Dynaamisen mallin rakenne ja toiminta	23
3.3.1 Ammoniumtypen metabolia.	23
3.3.2 Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen metabolia.....	29
3.3.3 Säilörehun liukenemattoman typen metabolia.....	35
4. Tulosten tarkastelu	43
4.1 Koerehujen laatu ja typen jakautuminen eri osafraktioihin	43
4.2 Ravintoaineiden syönti, dieetin sulavuus ja maidontuotanto.....	43
4.3 Dynaamisen mallin käyttökelpoisuus	44
4.3.1 Virtauskinetiikka.....	45
4.3.2 Ammoniumtypen metabolia	48
4.3.3 Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen metabolia.....	52
4.3.4 Säilörehun liukenemattoman typen metabolia.....	58
4.3.5 Virhetekijät	63
5. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	66
Kirjallisuus	68

Taulukot

Taulukko 1. Koeasetelma ja koekäsittelyt eri jaksoilla.....	9
Taulukko 2. Näytteenottoaikataulu (Näytteet I).....	12
Taulukko 3. Näytteenottoaikataulu (Näytteet II).....	12
Taulukko 4. Timoteisäilörehun, ^{15}N merkatun säilörehun ja väkirehuseoksen kemiallinen koostumus.....	20
Taulukko 5. Kokeessa käytetyn ^{15}N -säilörehun määrä, kemiallinen koostumus ja jakautuminen valkuaisen eri osafraktioihin.....	21
Taulukko 6. Pötsiin annostellun ammoniumsulfaatin sekä säilörehun liukoisen ja liukenemattoman fraktion tuorepaino, kuivapaino, kokonaistypen määrä sekä ^{15}N osuus yli taustarikastumisen näissä fraktioissa.	22
Taulukko 7. Keskimääräinen eläinkohtainen ravintoaineiden syönti päivässä.	22
Taulukko 8. Ammoniumtypen metaboliareitit ja parametriarvot.....	25
Taulukko 9. Mallissa 1 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.	28
Taulukko 10. Ammoniumtypen simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.....	28
Taulukko 11. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) metaboliareitit ja parametriarvot.....	31
Taulukko 12. Mallissa 2 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.	33
Taulukko 13. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.....	34
Taulukko 14. Säilörehun liukenemattoman typen metaboliareitit ja parametriarvot.	37
Taulukko 15. Mallissa 3 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.	41
Taulukko 16. Säilörehun liukenemattoman typen ja sen liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) jäännösfraktion simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.	42

Kuviot

Kuvio 1. Pötsin ruokasulanäytteet ja niiden analysointi.	14
Kuvio 2. Malli 1. Ammoniumtypen metaboloituminen pötsissä.....	24
Kuvio 3. Ammoniumtypen ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	26
Kuvio 4. Pötsin bakteerien ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	26
Kuvio 5. Pötsin alkueläinten ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	27
Kuvio 6. Malli 2. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) metaboloituminen pötsissä	30
Kuvio 7. Ammoniumtypen ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	32
Kuvio 8. Pötsin bakteerien ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	32
Kuvio 9. Pötsin alkueläinten ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	33
Kuvio 10. Malli 3. Säilörehun liukenemattoman typen metaboloituminen pötsissä.....	36
Kuvio 11. Ammoniumtypen ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	38
Kuvio 12. Pötsin bakteerien ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	38
Kuvio 13. Pötsin alkueläinten ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	39
Kuvio 14. Pötsin liukenemattoman typen ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	39
Kuvio 15. Rehuvalkuaisen C-fraktion ¹⁵ N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.	40
Kuvio 16. Ammoniumtypen ¹⁵ N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.	50
Kuvio 17. Pötsin bakteerien ¹⁵ N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.	51

Kuvio 18. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.	51
Kuvio 19. Ammoniumtypen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.	53
Kuvio 20. Pötsin bakteerien ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.	53
Kuvio 21. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.	54
Kuvio 22. Ammoniumtypen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.	59
Kuvio 23. Pötsin bakteerien ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.	59
Kuvio 24. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.	60
Kuvio 25. Liukenemattoman valkuaisen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.....	62
Kuvio 26. Rehuvalkuaisen C-fraktion ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.....	62

1. Johdanto

Pötsissä potentiaalisesti hajoavat tyypelliset yhdisteet ovat peräisin rehusta, pötsin sisäisestä typenkierrrosta, syljestä ja pötsistä irronneista epiteelisoluista. Valkuaisaineet hajoavat pötsissä mikrobien tuottamien proteaasientsyymien vaikutuksesta. Rehuvalkuaisen ja solunulkoisten proteolyyttisten entsyymien kiinnittyminen toisiinsa vaatii aina vettä (Jouany 1996). Siksi rehuvalkuaisen hajoamisnopeus on suuresti riippuvainen sen liukoisuudesta nesteeseen (Russell ym. 1992). Rehutypen fraktiointi liukoisuuden mukaan antaa suuntaa valkuaisen pötsihajoavuudesta, kun jokaiselle fraktiolle oletetaan tyypillinen vakiosulatusnopeus. Tarkempaan arvioon rehutypen pötsihajoavuudesta päästään, kun kullekin fraktiolle määritetään sulatusnopeus kokeellisesti. Pötsissä hajoava valkuainen ja ohitusvalkuainen ovat ruokintatilanteen mukaan muuttuvia tekijöitä kuten rehun energia-arvokin.

Pötsissä tapahtuvaan valkuaisaineiden hajotukseen eli proteolyysiin vaikuttavat rehun liukoisen ja liukenemattoman typen osuuksien lisäksi rehuvalkuaisen polypeptidiketjun aminohappojen sekvenssi, mikrobien proteolyttinen aktiivisuus, rehujen sulatus- ja virtausnopeus, pötsin pH sekä mikrobeille käytettävissä olevan energian määrä (Sniffen ym. 1992; Stern ym. 1994). Mikrobit tarvitsevat valkuaisynteesissä tiettyjä ravintoaineita, kuten rikkiä, haaraketjuisia rasvahappoja ja hivenaineita. Normaalessa pötsiolosuhteissa mikään näistä ravintoaineista ei ole synteesiä rajoittava tekijä. Synteesin määrä ja nopeus johtuvat suurelta osin käytettävissä olevan typen (ammoniumtyppi, aminohapot ja peptidit) sekä sulavien hiilihydraattien määrästä (Stern ym. 1994). Ohutsuolessa olevan ruokasulan aminohappokoostumus vastaa suurelta osin mikrobivalkuaisen aminohappokoostumusta, sillä 54-69 % (Korhonen ym. 2002) ohutsuoleen tulevasta ei-ammoniumtypestä (NAN) on peräisin pötsin mikrobitypestä.

Rehuvalkuainen koostuu eri nopeuksilla hajoavista tyypellisistä yhdisteistä ja lisäksi täysin sulamattomasta rehuvalkuaisesta. Rehuvalkuaisen laatua ja käyttöarvoa voidaan arvioida jakamalla rehun raakavalkuainen eri tyyppifraktioihin hajoavuuden ja liukoisuuden mukaan. Yhdysvalloissa tätä hyödynnetään Cornellin hiilihydraatti- ja proteiinimallissa (Cornell Net Carbohydrate and Protein System, CNCPS). Mallissa rehuvalkuainen muodostuu kolmesta eri fraktiosta: A (ei-valkuaisyppi eli NPN), B (valkuaisyppi) ja C (sulamaton valkuaisyppi) (Pichard ja Van Soest 1977). Valkuaisyppi jaetaan kolmeen alafraktioon (B_1 , B_2 ja B_3) niille luontaisen pötsihajoavuuden mukaan. A-fraktio on ei-valkuaisyppiä, B_1 -fraktio muodostaa

liukoisen valkuaistypen ja fraktiot B₂-, B₃- sekä C-fraktio liukenemattoman valkuaistypen (Van Soest ym. 1981, Krishnamoorthy ym. 1983). Ei-valkuaistyyppi eli NPN (ammoniumtyppi, aminohapot ja peptidit) muuttuu pötsissä erittäin nopeasti ammoniumtypeksi. Fraktio B₁ on trikloorietikkahapolla saostuva puskuriliukoinen tyyppi, joka hajoaa nopeasti pötsissä. (Van Soest ym. 1981, Krishnamoorthy ym. 1983). Fraktio B₃ on liukenematon neutraalidetergenttiin, mutta liukeneva happodetergenttiin. Tämä fraktio sulaa hitaasti pötsissä, koska se on kuituun sitoutuneena. Suuri osa B₃-fraktiosta ohittaa pötsin hajoamatta. Puskuriin liukenemattoman valkuaisen ja neutraalidetergenttiin liukenemattoman valkuaisen erotuksena saadaan fraktio B₂, josta osa hajoaa pötsissä ja osa ohittaa sen. Fraktio C on liukenematon happodetergenttiin ja sisältää valkuaisaineet, jotka ovat sitoutuneet ligniiniin, tanniini-proteiinikomplekseihin ja maillard-tuotteisiin (Van Soest ym. 1981). Valkuaisen liukoisuus ja hajoavuus eivät ole suoraan yhteydessä, ja siksi ne tulee erottaa toisistaan eri fraktioissa (Roe ja Sniffen 1994). Esimerkiksi kaikki B-fraktiot ovat pötsissä potentiaalisesti hajoavia, mutta voivat myös ohittaa pötsin. Vastaavasti liukoisia fraktioita ovat vain fraktiot A ja B₁. Myöskään typen liukoisuudelle ja NAN:n virtaukselle ohutsuoleen ei ole havaittu selkeää yhteyttä. Esimerkiksi kaseiini hajoaa täysin pötsissä, mutta ei silti ole helposti liukenevaa. Albumiini puolestaan on hitaasti hajoavaa, mutta silti helposti liukenevaa (Stern ym. 1994).

Tuoreessa ruohossa valkuaistypen osuus on 75 - 90 % kokonaistypestä (Rinne ym. 1997). Nurmirehujen nopea proteolyysi alkaa heti niiton jälkeen kasvin omien entsyymien toimesta ja jatkuu säilönnän aikana mikrobialisena hajotuksena. Kasvin entsyymaattisen hajotuksen lopputuotteena syntyy pääasiassa aminohappoja ja pieniä määriä ammoniumtypeä. Pääosa ammoniumtypen tuotannosta tapahtuu mikrobihajotuksen seurauksena säilönnän aikana (Rinne ym. 1997). Keskeisin syy nurmirehujen nopeaan proteolyysiin ja typen heikkoon hyväksikäyttöön pötsissä on niiden korkea liukoisen typen osuus raakavalkuaisesta (säilörehussa 40 - 50 %) (Ahvenjärvi ym. 1999). Lähes kaikki nurmirehujen liukoinen tyyppi on NPN-muodossa. Vastaavasti B₁-fraktion osuus on pieni (noin 5 % liukoisesta typestä) (Ahvenjärvi ym. 1999). Rehun typpifraktioiden keskinäisillä osuuksilla on huomattava merkitys valkuaisen hyväksikäytölle ja hajoamisnopeudelle. Virtausnopeudesta ja pötsin olosuhteista riippuen A ja B₁-fraktio hajoavat lähes kokonaan pötsissä, mutta B₃-fraktiosta ehtii hajota puolestaan vain pieni osa. Nurmiheinäkasveilla heinän B₁-fraktion hajoavuusnopeus on 120-150 %/h, B₂-fraktion 10 - 12 %/h ja B₃-fraktion 0,08 - 0,10 %/h. Säilörehulla vastaavat arvot ovat 200-300 %/h, 12-15 %/h ja 1,0-1,3 %/h. A-fraktion oletetaan

sulavan välittömästi ja C-fraction oletetaan olevan sulamatonta (Sniffen ym. 1992). Pötsin proteolyysin määrää ja nopeutta kontrolloivat partikkeli- (SAB) ja nestefaasiin (LAB) sitoutuneet bakteerit sekä pötsin alkueläimet. Eläimen dieetistä ja pötsin olosuhteista riippuen partikkelifaasi sisältää kahdesta neljään kertaa enemmän mikrobimassaa nestefaasiin verrattuna. Lisäksi 50 – 65 % partikkeleihin sitoutuneesta tyypestä on mikrobiperäistä (Graig ym. 1987). Cornell'in mallissa pötsin bakteerit on jaoteltu solunseinämähiilihydraatteja fermentoiviin (SC) tai solunsisällyshiilihydraatteja fermentoiviin (NSC). Solunseinämäainesta hajottavien bakteerien kasvu hidastuu ja niiden osuus vähenee pötsissä rehun neutraalidetergenttikuitu (NDF) -pitoisuuden pienentyessä ja pötsin happamuuden lisääntyessä. Solunseinämäainesta hajottavat bakteerit käyttävät ainoastaan ammoniumtyyppiä typenlähteenään eivätkä fermentoi aminohappoja tai peptidejä. Solunsisällyshiilihydraatteja fermentoivat bakteerit käyttävät sekä ammoniumtyyppiä, aminohappoja että peptidejä typenlähteenään ja tuottavat ammoniumtyyppiä (Russell ym. 1992). Typellisten yhdisteiden hyväksikäyttö ja prioriteetti (ammoniumtyppi vs. aminotyyppi) on riippuvainen peptidien saatavuudesta ja käytettävissä olevasta hiilihydraatin laadusta (SC vs. NSC). In vitro -kokeissa on havaittu, että NSC-bakteerit ottavat 66 % tarvitsemastaan tyypestä peptidien ja aminohappojen muodossa ja vastaavasti 34 % ammoniumtyypinä (Russell 1992). Mikrobien kasvunopeus ei vaikuta merkitsevästi näihin suhteisiin, mutta jos peptidejä tai aminohappoja ei ole riittävästi käytettävissä, täytetään loppu typen tarve ammoniumtyypellä.

Alkueläinten merkittävä rooli pötsin proteolyysissä johtuu niiden kyvystä syödä pötsin partikkeleita ja niiden mukana myös bakteerimassaa. Siksi ne hajottavat aktiivisemmin liukenematonta valkuaista kuin liukenevaa. Bakteerit ovat samalla alkueläinten tärkein aminohappojen lähde. Alkueläinten poistaminen pötsistä (defaunaatio) vähentää ammoniumtypen, peptidien ja vapaiden aminohappojen konsentraatioita sekä lisää ohutsuoleen virtaavaa hajoamattoman rehuvalkuaisen sekä NAN:n määrää. Samalla mikrobivalkuaisen synteesi vähenee, koska proteolyysin lopputuotteita on vähemmän saatavilla (Jouany 1996).

Rehuvalkuaisen pilkkoutuessa polypeptidiketju hajoaa ensin pitkäketjuisiksi peptideiksi ja siitä edelleen lyhytketjuisiksi peptideiksi. Peptidit pilkkoutuvat edelleen aminohapoiksi di- ja tripeptidaasien avulla. Näin ollen peptidien hydrolyysi pötsissä on kaksivaiheinen tapahtuma (Wallace 1996). Lyhytketjuiset peptidit ovat pääasiallinen proteolyysin lopputuote ja vapaiden aminohappojen suhteellinen osuus on pötsissä pieni. Volden ym. (2002) havaitsivat,

että yli 95 % aminohapoista oli hävinnyt pötsistä ensimmäisen tunnin kuluessa ruokinnasta. Mikrobin peptidienotto- ja eksopeptidaasien määrä ovat enemmän proteolyysia rajoittavia tekijöitä kuin polypeptidiketjun pilkkomisnopeus peptideiksi. Peptidien hydrolyysi on yleensä hidasta, ja peptidejä kerääntyy herkästi pötsiin (Chen ym. 1987). Volden ym. (2002) havaitsivat, että säilörehun liukoisessa fraktiossa lyhytketjuisten peptidien tyyppien hajoavuus oli hitaampaa kuin pitkäketjuisten peptidien. Lisäksi ruokintatason nosto hidasti lyhytketjuisten peptidien hajoavuutta. Koska mikrobin peptidien otto on rajallista ja koska peptidien hajoamisnopeus hidastuu ruokintatason noustessa, osa peptideistä ja liukoisesta typpifraktiosta saattaa virrata pötsistä ulos hajoamatta (Volden ym. 2002). Choi ym. (2002) havaitsivat, että suurin osa ruokasulan nestefaasin liukoisesta ei-ammoniumtyyppi -fraktiosta (SNAN) oli peräisin peptideistä. Lisäksi suurin osa (68 %) pötsistä virtaavasta SNAN:stä oli peräisin mikrobeista (Choi ym. 2002). Tämän mukaan aikaisemmissa tutkimuksissa peptidityypin virtaus on arvioitu oikein, mutta rehuperäisen peptidityypin määrä on yliarvioitu.

Ammoniumtyyppi on peräisin joko rehun NPN -poolista tai peptidien hajoamisesta. Suurin osa pötsimikrobeista käyttää ammoniumtyyppiä tyypinlähteenään, mutta useimmiten ammoniumtyyppiä tuotetaan nopeammin, kuin mikrobit ehtivät sitä käyttää. Ammoniumtyyppi on tärkein välituote mikrobin muodostaessa rehun tyypellisistä yhdisteistä mikrobivalkuaista. Ammoniumtyypin pitoisuus pötsissä vaihtelee paljon. Useiden tutkimusten perusteella riittävä ammoniumtyypin pitoisuus mikrobivalkuaisten synteesin maksimoimiseksi vaihtelee välillä 5-11 mmol/l (Satter ja Slyter 1974; Allen ja Miller 2005; Hume ym. 2005; Okorie ym. 2005). Yleisen käsityksen mukaan ammoniumtyypin pitoisuuden ylittäessä minimitason sen lisääntymisestä ei ole hyötyä pötsimikrobeille. Optimaalisen konsentraation lisäksi ammoniumtyypin määrää on tärkeä verrata myös fermentoituvan orgaanisen aineen määrään. Useissa tutkimuksissa on havaittu, että pötsimikrobit tarvitsevat ammoniumtyyppiä valkuaisynteesin maksimoimiseksi ja että suurin osa (>80 %) mikrobeista kasvaa normaalisti tai hyvin, kun ammoniumtyyppi toimii ainoana tyypin lähteenä (Morrison ja Mackie 1996). Huomattavasti vähemmän on tutkittu sitä, millaiset ammoniumtyypin, aminohappotyyppien ja peptidityypin konsentraatiosuhteet optimoivat pötsin mikrobivalkuaisten synteesin.

Nurmiheinäkasvipohjaisella dieetillä suuri osa pötsin tyypellisistä yhdisteistä hajoaa pötsissä. Ahvenjärvi ym. (2002) havaitsivat, että yksinomaisella säilörehuruokinnalla 54 % satakertaan virtaavasta NAN:stä on mikrobialaista ja vastaavasti 46 % rehuperäistä. Faichney ym. (1997) havaitsivat, että NAN:n virtaus ohutsuoleen on käänteisesti verrannollinen ammoniumtyypin

hävikkiin pötsissä. Tähän vaikuttaa suurelta osin alkueläinten määrä pötsissä sekä ammoniumtypen synteesi. Mikrobien valkuaisynteesin optimoimiseksi hiilihydraatteja ja tyypellisiä tuotteita tulee olla saatavilla keskenään oikeissa suhteissa. Jos proteolyysin nopeus ylittää hiilihydraattien fermentaationopeuden, suuri osa tuestä menetetään ammoniumtypen ja lopulta urean muodossa. Toisaalta jos hiilihydraattien fermentaationopeus ylittää proteolyysin nopeuden, mikrobisynteesin tehokkuus heikkenee. Mikäli dieetti on kokonaisuudessaan hitaasti hajoavaa, pötsin täyteisyys saattaa rajoittaa syöntikykyä, mikrobien rakennusaineiden saantia ja lopulta myös mikrobisynteesiä. Lisäksi osa hitaasti hajoavista ravintoaineista ohittaa pötsin ja jää hyödyntämättä. Liian sulava dieetti tarjoaa runsaasti ravintoaineita, mutta lisää pötsin happamuutta ja heikentää mikrobien kasvuolosuhteita (Russell ym. 1992).

Mikrobivalkuaisen synteesin tehokkuutta (EMPS) voidaan arvioida laskemalla tuotettu mikrobitypen määrä (g) ja suhteuttamalla se orgaanisen aineen (OM) hajoavuuteen pötsissä. Useissa ulkomaisissa in vitro-tutkimuksissa on todettu, että säilörehua syöville lehmille nopea ja epätasainen tyypellisten yhdisteiden saanti suhteessa hiilihydraatteihin heikentää mikrobivalkuaisen synteesin tehokkuutta (Givens ja Rulquin 2004; Bach ym. 2005; Firkins ym. 2007). Suomalaisen in vivo-tutkimusten perusteella tätä ei ole havaittu (Jaakkola ja Huhtanen 1992). Mikrobivalkuaisen synteesin tehokkuus (EMPS = mikrobityppeä, g / sulava OM) on ollut nurmiheinäkasvien säilörehulle keskimäärin 30,1 g, nurmipalkokasvien säilörehulle 19,5 g, kokoviljasäilörehulle 35,9 g ja maissisäilörehulle 48,4 g (Givens ja Rulquin 2004). Tärkkelyspitoisten tuotteiden korvaaminen kuitupitoisilla tuotteilla, NPN:n korvaaminen hyvälaatuisella valkuaisella ja hajoavan valkuaisen osuuden lisääminen parantavat asteittain synteesin tehokkuutta (Huhtanen 1992; Stern ym. 1994). Synteesin tehokkuuden lukuarvo ei kuitenkaan kerro sitä, kuinka tehokkaasti pötsin bakteerit käyttävät pötsissä käytettävissä olevan typen. Tätä voidaan arvioida jakamalla syntetisoituvan bakteeritypen määrä potentiaalisesti käytettävissä olevan typen määrällä pötsissä (ENU = (bakteeri N, g / käytettävissä oleva N, g) x 100). Nurmisäilörehuilla useiden kokeiden keskiarvoksi on saatu 0,64 (Givens ja Rulquin 2004). Valkuaiseeseen perustuvat mittausten menetelmät ovat suuresti riippuvaisia dieetin valkuaispitoisuudesta. Kumpikaan edellämainituista menetelmistä ei yksinään anna realistista kuvaa mikrobivalkuaisen synteesin tehokkuudesta, mutta optimia voidaan ennustaa hyödyntämällä sekä EMPS- että ENU-menetelmiä. Bach ym. (2005) arvioivat in vitro -tulosten perusteella, että optimaalinen bakteerien kasvu pötsissä saavutetaan, kun EMPS = 29 g ja ENU = 69 %. Tämä tarkoittaisi

sitä, että mikrobit hyötyisivät pötsistä hajoavasta valkuaisesta, joka ylittää mikrobien nettotarpeen.

Suomessa rehuvalkuaisen laatua ja käyttöarvoa arvioidaan ohutsuolessa imeytyvän valkuaiseen (OIV) ja pötsin valkuaiastaseeseen (PVT) perustuvan järjestelmän avulla. Tämä pohjoismainen in vivo –tutkimuksiin pohjautuva rehuarvojärjestelmä arvioi rehuvalkuaisen käyttöarvoa perustuen aminohappojen nettoimeytymiseen ohutsuolessa ja pötsimikrobien typen ottoon pötsissä. Mikrobivalkuaisen synteesin määrän laskennassa järjestelmä käyttää lukuarvoa $179 \text{ g mikrobiraakavaluaista} \times (\text{rehun sulavat raakahiilihydraatit (g/kg rehun KA)} + \text{hajoavan valkuaisen osuus (g/kg rehun KA)}) / 1000$ (Madsen 1985). Koska syntetisoituvan mikrobivalkuaisen määrä perustuu sekä hajoavan valkuaisen että sulavien hiilihydraattien määrään, on jokaisen rehun osalta mahdollista arvioida, onko hajoavan valkuaisen lisäämisestä dieettiin mikrobeille hyötyä vai ei. Suomalaisissa rehutaulukoissa normaali korjuuasteella tehdyssä ensimmäisen sadon nurmisäilörehussa $\text{OIV} = 86 \text{ g/kg KA}$ ja $\text{PVT} = 14 \text{ g/kg KA}$ (MTT 2006). Moniin muihin rehuarvojärjestelmiin verrattuna pohjoismainen järjestelmä ennustaa rehuvalkuaisen laadun ja käyttöarvon eroja hyvin tarkasti (Tuori ym. 1998).

Ruoansulatuksen monimutkaisia ja yhtäaikaista prosesseja voidaan kuvailla erilaisten empiiristen sekä dynaamisten mallien avulla. Tyypillisesti malleissa lasketaan ravintoaineiden saantia ja optimaalista kasvua, tutkitaan verenkiertoa tai määritetään solun sisään virtaavien aineiden nopeutta ja määrää (Wastney ym. 1993). Dynaaminen mallintaminen sekä mallin rakentaminen vaativat tarkkaa tietoa systeemin rakenteesta sekä systeemin eri osien riippuvuuksista, sillä mallin tulee ennustaa ruoansulatuksen yhtäaikaista prosesseja tarkasti ja luotettavasti. Dynaamista mallintamista on hyödynnetty muun muassa rehun sulavuus- ja virtauskinetiikan tutkimuksissa märehittäjillä. Baldwinin kehittämä Molly-malli on yksi esimerkki koko eläimen ruoansulatusta ja aineenvaihduntaa kuvaavasta dynaamisesta mallista (Hanigan ym. 2006). Mallin heikkoutena on pidetty epätarkkuutta kuidun sulatusta ennustettaessa. Lisäksi malli yliarvioi rasvan sulatuksen (Hanigan ym. 2006). Yhteispohjoismaisen Karoline -mallin avulla on mallinnettu NDF:n sulavuuden määrän ja nopeuden vaikutuksia orgaanisen aineen sulavuuteen, pötsin NDF:n poolikokoon ja mikrobityypen virtaukseen pötsistä (Danfær ym. 2006). Karoline on yksi monista dynaamisista malleista, joita myös kehitetään edelleen. Nykyinen kaksiosainen malli perustuu sulavaan ja sulamattomaan NDF-kuituun, jossa ensimmäisessä poolissa potentiaalisesti sulava NDF

(DNDF) katoaa joko virtauksena toiseen pooliin tai sulavana energiana. Toisesta poolista DNDF häviää sulavana energiana tai ulosvirtauksena pötsistä. Rehun potentiaalisesti sulamaton NDF (INDF) häviää ainoastaan virtaamalla ensimmäisestä poolista toiseen ja siitä edelleen ohutsuoleen (Allen ja Mertens 1988).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää säilörehun typen metaboloitumista pötsissä ja kuvata rehutypen jakautumista eri metaboliareitteihin dynaamisten mallien avulla. Aikaisempien tutkimusten perusteella oletettiin, että pieni osa tuestä imeytyy suoraan pötsin seinämän läpi, mutta suurin osa virtaa ulos pötsistä nestefaasin, nesteeseen sekä partikkeleihin sitoutuneiden bakteerien ja alkueläinten mukana. Tulosten tarkastelussa keskityttiin erityisesti ammoniumtypen sekä säilörehun liukoisen ja liukenemattoman fraktioiden metaboloitumiseen pötsissä sekä dynaamisten mallien käyttökelpoisuuteen typen metaboloitumista tutkittaessa. Merkkiaineena käytettiin ^{15}N isotooppia ja tulokset laskettiin ^{15}N taustarikastumisena. Ilmakehän tuestä ^{15}N isotoopin osuus on 0,3663 %. Maaperässä osuus on yleensä suurempi ja kasveissa ^{15}N osuus vaihtelee, mutta on yleensä suurempi kuin ilmassa. Mallintamista käytettiin kuvaamaan pötsissä tapahtuvaa typpimetaboliaa. Malleja kehitettiin ja arvioitiin WinSAAM (version 3.0.7) ohjelmistolla (Wastney ym 1993). Kokeessa havaintoaineiston perusteella luotiin mallit, joiden avulla ennustetut arvot pyrittiin saamaan mahdollisimman lähelle havaittuja arvoja. Havaittuja ja ennustettuja arvoja verrattiin toisiinsa ja arvioitiin mallien käyttökelpoisuutta.

2. Aineisto ja menetelmät

Koe suoritettiin ajanjaksolla 2.3.-26.4.2002 Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksessa (MTT) Jokioisilla, kotieläintuotannon tutkimusosaston koe-eläintallilla. Kokeen tarkoituksena oli määrittää ammoniumtypen ja säilörehun liukoisen sekä liukenemattoman valkuaisen metaboloitumista pötsissä sekä kuvata ammoniumtypen sekä säilörehun liukoisen ja liukenemattoman fraktion virtauskinetiikkaa alempaan ruoansulatuskanavaan.

2.1 Koeasetelma ja koe-eläimet

Koeasetelmana oli 4 x 4 latinalainen neliö, jossa oli neljä eläintä, neljä jaksoa ja neljä koekäsittelyä. Koe-eläiminä olivat neljä usean kerran poikinutta ayrshire-lypsylehmää, jotka olivat parsiin kytkettyinä koko kokeen ajan. Lehmien poikimisesta oli kulunut keskimäärin 68 pv. (± 27 pv). Lehmät saivat 10 kg/pv väkirehuseosta ja hapolla (AIV 2000, 5,4 l/tn) säilöttyä esikuivattua säilörehua vapaasti siten, että jätettä jäi 5-10 %. Väkirehu sisälsi ohraa, kauraa, melassileikettä ja rypsirouhetta, kutakin 243 g/kg sekä kivennäisseosta 24 g/kg (Viher-Minera Muro, Suomen Rehu Ltd.) ja ruokintakalkkia 4 g/kg. Säilörehu ja väkirehu jaettiin neljä kertaa päivässä klo 6, 9, 18 ja 20. Lisäksi jokaisella eläimellä oli suolakivi (NaCl) sekä vettä vapaasti saatavilla koko kokeen ajan. Kaikilla lehmillä oli parsimatot, joiden päälle levitettiin lisäksi turvetta.

Jokaisen koejakson pituus oli 14 päivää, jonka aikana jokainen eläin sai yhden koeasetelman mukaisen koekäsittelyn. Eläinten pötsit tyhjennettiin jakson aikana kolme kertaa siten, että eläimet jaettiin kahden eläimen ryhmiksi (1. ryhmä: eläimet 2 ja 4, 2. ryhmä: eläimet 1 ja 3), jotka käsiteltiin peräkkäisinä päivinä. Ensimmäinen pötsin tyhjennys tehtiin koejakson 6. pv (1. ryhmä) ja 7. pv (2. ryhmä) klo 11, toinen tyhjennys 10. ja 11. pv klo 7 ja kolmas tyhjennys 13. ja 14. pv klo 15. Merkkiaineiden annostelu tapahtui pötsin toisen tyhjennyskerran yhteydessä. Pötsin tyhjennyksiä tehtiin yhteensä kolme, koska pötsin poolikoot määritettiin kolmen tyhjennyksen keskiarvona. Koekäsittelyinä olivat neljä erilaista valkuaislähdettä (ammoniumsulfaatti AS; kaseiini KAS; säilörehun liukoinen osa SR-L; säilörehun liukenematon osa SR-K) (taulukko 1), jotka annettiin kunkin jakson kymmenentenä ja yhdentenätoista päivänä kerta-annoksena suoraan pötsiin siten, että kussakin annoksessa oli noin 1000 mg ^{15}N .

Taulukko 1. Koeasetelma ja koekäsittelyt eri jaksoilla.

Jakso	Lehmä			
	1	2	3	4
I	AS	SR-L	SR-K	KAS
II	SR-K	AS	KAS	SR-L
III	SR-L	KAS	AS	SR-K
IV	KAS	SR-K	SR-L	AS

Eri valkuaislähteiden typen metaboloitumista tutkittiin määrittämällä ^{15}N rikastuminen ajan funktiona pötsin typpifraktioissa (ammoniumtyppi, bakteerit, alkueläimet, liukenematon rehutyppi ja rehualkuaisen C-fraktio). Maitotuotos, rehuannokset ja jätteet punnittiin päivittäin koko kokeen ajan.

2.2 Koerehujen kasvatus ja ^{15}N merkattun säilörehun valmistus

Kokeessa käytetty ^{15}N merkattu säilörehu tehtiin kesällä 2001 kasvaneen neljännen vuoden timoteinurmen (96,1 % *Phleum pratense*) ensimmäisestä sadosta, josta sadonkorjuuvaiheessa 38 % oli tähkätöntä ja 62 % oli tähkällä tai tulossa tähkälle. Timoteinurmi (25 m²) lannoitettiin ammoniumsulfaatilla ((NH₄)₂SO₄, lannoitustaso 100 kg N/ha), jonka tyyppästä 10 % oli ^{15}N -isotooppia. Lisäksi fosforia ja kaliumia annettiin molempia 20 kg/ha. Ensimmäinen sato korjattiin 20.6.2001. Ruohoa oli yhteensä 82,5 kg (kuiva-aine (KA) pitoisuus 178 g/kg). Ruohoa kuivattiin kylmäilmakuivurissa (+ 20 °C) 3 h, silputtiin ja levitettiin 10 kg:n erissä muoveille kuivumaan. Säilöntäaine (muurahaishappoa 5 ml/kg) lisättiin jokaiseen erään sen jälkeen kun kaikki erät oli silputtu. Erät yhdistettiin (yhteispaino 61,19 kg), otettiin edustava näyte ja säilöttiin pleksisiiloihin. Siilot täytettiin siten, että jokaiseen siiloon tuli 7,5 kg tuoretta ruohoa (KA-pitoisuus 219,8 g/kg). Kahdeksan kuukauden säilönnän jälkeen säilörehusiilot avattiin ja koetta varten punnittiin ja pakastettiin (-20 °C) neljä 9 kg annosta.

Ensimmäisen jakson viidentenä päivänä yksi annos ^{15}N -merkattua säilörehua otettiin pakasteesta kylmiöön sulamaan ja kuudentena päivä kylmiöstä huoneenlämpöön. Säilörehun liukoisen ja liukenemattoman osien erottelu tapahtui pesemällä rehu niukalla vesimäärällä kolmeen kertaan. Rehun joukkoon kaadettiin kolme kilogrammaa huoneenlämpöistä tislattua vettä, annettiin liota 30 minuuttia ja puristettiin kuivaksi säilörehupuristimella 38 µm nailonkankaan läpi. Pesu toistettiin vielä kahdesti siten, että vettä käytettiin yhteensä 9 kg. Säilörehun liukoisesta ja liukenemattomasta fraktiosta otettiin näytteet kemiallisen koostumuksen analysointia varten ja molempien säilörehufraktioiden määrä punnittiin

leimattujen typpifraktioiden annosmäärän laskemiseksi. Kokeen muut valkuaislähteet käsiteltiin siten, että yksi annos kaseiinia sekoitettiin 1,5 litraan vettä ja säilytettiin yön yli. Ammoniumsulfaattia punnittiin 40 g (yhteensä 848 mg ^{15}N) ja liuotettiin yhteen litraan tislattua vettä.

Pötsin liukoisten fraktioiden virtauskinetiikkaa tutkittiin pötsinesteeseen liukenevan ulkoisen merkkiaineen (LiCoEDTA:n) avulla. Merkkiainetta punnittiin jokaiselle eläimelle 5 g ja liuotettiin 500 ml tislattua vettä (Udén ym. 1980). Liukenemattomien partikkelien (bakteerit, alkueläimet ja liukenematon rehutyppi) virtaus estimoitiin kussakin mallissa erikseen WinSAAM -ohjelmalla.

2.3 Näytteiden otto ja analysointi

2.3.1 Koerehujen näytteet

Säilörehusta otettiin näyte jokaisen jakson keruuviikolla. Väkirehusta ja väkirehun komponenteista otettiin näyte jokaisesta valmistuserästä. Näytteistä analysoitiin primäärinen KA (105 °C, 18 h) sekundäärinen KA (105 °C, 16 h), kokonaistyyppi (N), tuhka, NDF, happodetergenttikuitu (ADF), INDF sekä happoon liukenematon tuhka (AIA). Tuoreista näytteistä analysoitiin lisäksi haihtuvat rasvahapot (VFA), pelkistävät sokerit, maitohappo, pH ja ammoniumtyppi (NH_4^+).

Siilojen avauksen jälkeen ^{15}N -merkatusta säilörehusta otettiin näyte, josta osa analysoitiin tuoreena ja osa pakkaskuivattiin. Tuoreesta näytteestä analysoitiin primäärinen KA, N, VFA, pelkistävät sokerit, maitohappo, pH, ja NH_4^+ . Tämän jälkeen säilörehu jaettiin liukoiseen ja liukenemattomaan osaan, liukoisesta osasta analysoitiin valkuaisfraktiot A, B_1 ja liukenemattomasta osasta fraktiot A, B_1 , B_2 , B_3 ja C. Kolmen pesukerran jälkeen yhdistetystä liukoisesta osasta otettiin kolme näytettä. Ensin otettiin 15 ml näyte, johon lisättiin 0,3 ml 50 % rikkihappoa (H_2SO_4) Näytteestä analysoitiin NH_4^+ ja ^{15}N -% NH_4^+ :ssa. Lisäksi otettiin 200 g näyte, johon lisättiin 1 ml HgCl_2 ja analysoitiin N, fraktiot A, B_1 sekä ^{15}N -% fraktioissa A ja B_1 . Säilörehun liukenemattomasta osasta tehtiin samat analyysit kuin liukoisesta osasta. Liukenemattomasta osasta analysoitiin lisäksi fraktiot B_2 , B_3 ja C sekä ^{15}N -% fraktioissa B_2 , B_3 ja C. Säilörehun liukoinen ja liukenematon osa punnittiin ja säilytettiin kylmiössä.

Kaseiinista otettiin edustava 20 g näyte, josta määritettiin primäärinen kuiva-aine. Lisäksi 50 g näyte pakkaskuivattiin ja analysoitiin sekundäärinen KA, tuhka, N, fraktiot A, B₁ ja B₂, sekä ¹⁵N-% kokonaistypestä ja fraktioista A, B₁ ja B₂. Loput kaseiinista jaettiin neljään yhtä suureen annokseen, jotka säilytettiin jääkaapissa.

2.3.2 Pötsin ruokasulanäytteet

Merkkiaineiden annostelu suoritettiin pötsin toisen tyhjennyskerran yhteydessä kunkin jakson peräkkäisinä päivinä kahdelle eläimelle kerrallaan (10. pv eläin 4 ja 2; 11. pv eläin 1 ja 3), jonka jälkeen pötsinäytteiden otto aloitettiin. Pötsit tyhjennettiin 1 h aamuruokinnan jälkeen kahteen taarattuun saaviin (50 l), joita pidettiin lämpöhauteessa koko tyhjennyksen ajan. Tyhjennyksen jälkeen ruokasulan kokonaismäärä punnittiin ja mitattiin tilavuus. Saavit tyhjennettiin kuumalla vedellä lämmitettyyn rehuvaunuun, ruokasula sekoitettiin perusteellisesti ja otettiin kolme edustavaa osanäytettä (I, II ja III) pakasterasioihin. Välittömästi näytteenoton jälkeen merkkiaine ja koerehut (Co-liuos, AS, KAS, SR-L ja SR-K) sekoitettiin pötsin sisältöön käsin sekoittaen. Sekoitetusta ruokasulasta otettiin klo 7.00 yksi näyte (II) ja ruokasula siirrettiin nopeasti takaisin pötsiin.

Näyte I (200 g) otettiin alkueläinten erottamiseksi ja käsiteltiin välittömästi lämpimänä. Näytteisiin II (200 g) ja III (2 x 200 g) lisättiin heti elohopeakloridi ja pakastettiin. Näytteiden II perusteella seurattiin pötsin kokonaistypen jakautumista eri fraktioihin ja ¹⁵N rikastumista näissä fraktioissa. Näytteistä III määritettiin typen poolikoko pötsin neste- ja partikkelifaasissa. Näytteitä I otettiin pötsistä 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 22, 27, 33, 39, 47, 55, 63 ja 72 h ja näytteitä II 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 22, 27, 33, 39, 47, 55, 63 ja 72 h merkkiaineiden annostelun jälkeen siten, että näytteiden keruu aloitettiin 10:n päivän aamuna lehmiltä 2 ja 4 ja 11:n päivän aamuna lehmiltä 1 ja 3 (taulukot 2 ja 3).

Taulukko 2. Näytteenottoaikataulu (Näytteet I).

Näytteenottoaika (klo)										
Eläimet 2 ja 4										
10. pv	6:55	8:00	9:00	10:00	11:00	13:00	15:00	18:00	21:00	0:00
11. pv	5:00	10:00	16:00	22:00						
12. pv	6:00	14:00	22:00							
13. pv	7:00									
Eläimet 1 ja 3										
11. pv	6:55	8:00	9:00	10:00	11:00	13:00	15:00	18:00	21:00	0:00
12. pv	5:00	10:00	16:00	22:00						
13. pv	6:00	14:00	22:00							
14. pv	7:00									

Taulukko 3. Näytteenottoaikataulu (Näytteet II).

Näytteenottoaika (klo)													
Eläimet 2 ja 4													
10. pv	6:55	7:00	7:30	8:00	8:30	9:00	10:00	11:00	13:00	15:00	18:00	21:00	0:00
11. pv	5:00	10:00	16:00	22:00									
12. pv	6:00	14:00	22:00										
13. pv	7:00												
Eläimet 1 ja 3													
11. pv	6:55	7:00	7:30	8:00	8:30	9:00	10:00	11:00	13:00	15:00	18:00	21:00	0:00
12. pv	5:00	10:00	16:00	22:00									
13. pv	6:00	14:00	22:00										
14. pv	7:00												

Pötsin ruokasulanäyte tuli olla mahdollisimman edustava. Näytettä otettiin 250 g verkkomahasta, pötsin vatsanpuoleisen osan pohjalta sekä pötsin selänpuoleisen osan etu- ja takaosasta, yhteensä 1000 g. Neljä osanäytettä yhdistettiin ja sekoitettiin. Edellisten näytteiden lisäksi otettiin näyte III pötsin tyhjennyksien yhteydessä. Toteutuneet näytteenottoajat kirjattiin aina tarkasti ylös.

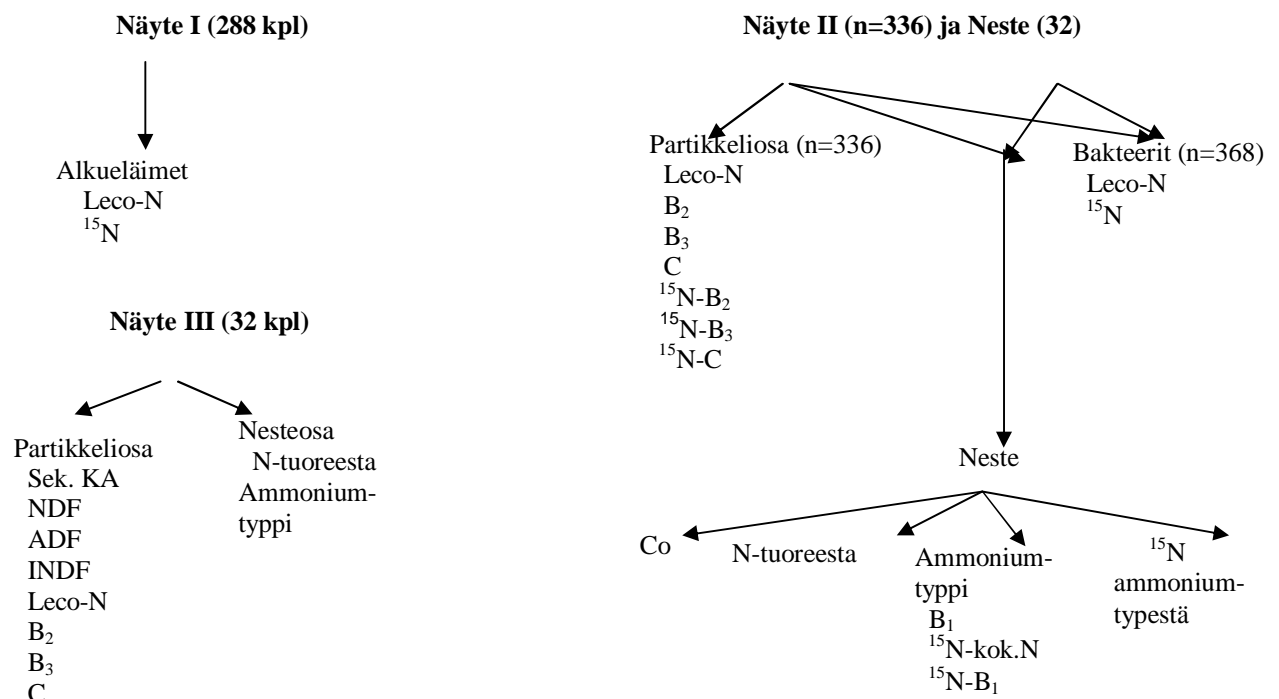
Näytteestä I erotettiin alkueläimet niiden pötsin poolikoon ja kemiallisen koostumuksen määrittämiseksi. Näyte I suodatettiin kaksinkertaisen harsokankaan läpi. Jäljelle jäänyttä sakkaa pestiin puskuriliuoksella (400 ml 39 °C) (Goering ja Van Soest 1970), johon oli lisätty galaktoosia 5 g/l alkueläinten ja rehupartikkeleiden erottelun helpottamiseksi. Harsokankaan läpi suodatettu nesteosa kaadettiin lämpimään erotussuppiloon ja pidettiin 30 min 39 °C lämpökaapissa. Tämän jälkeen lisättiin 10 ml 0,9 % (w/v) NaCl-liuosta, jossa oli 10 % (v/v) formaldehydiä. Noin 5 min kuluttua sedimentoituneet alkueläimet laskettiin erotussuppilosta suodatinsuppiloon, jossa oli 17 µm suodatinkangas. Alkueläinten mukana tuli myös sedimentoituneita rehupartikkeleita, jotka pestiin pois suodattimen avulla. Suodatinkankaalle

pidätyntä alkueläinsakkaa pestiin NaCl-liuoksella (100 g 0,9 % (w/v), jossa 5 % (v/v) formaldehydiä). Tämän jälkeen sakka huuhdeltiin suihkupulloa käyttäen pienellä NaCl-formaliiniliuosmäärällä 200 µm suodattimen läpi säilytysastiaan ja siirrettiin kylmiöön. Mikroskooppinen tarkastelu osoitti, että näytteessä oli edelleen rehupartikkeleita ja sen vuoksi ylimääräinen formaliiniliuos poistettiin sakan päältä imulla, minkä jälkeen kaikki alkueläinnäytteet sentrifugoitiin (3 min 150 x g) 30 % (w/v) sakkaroosiliuoksessa.

Näytteen II perusteella määritettiin liukoisen typen jakautuminen eri osafraktioihin pötsin nestefaasissa ja liukenemattoman typen jakautuminen partikkelifaasissa sekä ¹⁵N rikastuminen näissä fraktioissa. Näytettä otettiin pakastusrasiaan (200 g), punnittiin ja merkittiin paino ylös. Näytteeseen lisättiin heti 100 g 0,9 % (w/v) NaCl -liuosta jossa oli 50 ml/l kylläistä HgCl₂ -liuosta mikrobialisen ja entsymaattisen toiminnan pysäyttämiseksi. Näyte sekoitettiin, kirjattiin liuksen lisäyksen kellonaika tarkasti ylös ja pakastettiin. Jatkokäsittely aloitettiin ottamalla näytteet sulamaan jääkaappiin ja seuraavana aamuna huoneenlämpöön. Näyte suodatettiin kaksinkertaisen harsokankaan läpi jäähauteessa olevaan astiaan. Harsokangas ja astia punnittiin ennen ja jälkeen suodatuksen. Partikkeliosa siirrettiin tehosekoittimeen, johon lisättiin 400 g 0,9 % (w/v) NaCl-liuosta ja homogenisoitiin 60 sekuntia. Näyte siirrettiin tehosekoittimesta uudelleen harsokankaan päälle, suodatettiin neste samaan astiaan edellisen nesteen kanssa ja punnittiin nesteosa, sakka + harso ja märkäharso. Yhdistetty nesteosa sentrifugoitiin ensin swing-out roottoria käyttäen (500 g x 5 min), nesteosa poistettiin imulla ja punnittiin. Lopuksi sentrifugoitu sakka ja harsokankaalle jäänyt sakka yhdistettiin ja punnittiin. Neste sentrifugoitiin vielä uudelleen (10 000 g x 30 min), jonka jälkeen nesteosa ja jäljelle jäänyt bakteerimassa punnittiin ja pakastettiin.

Näytteen III perusteella määritettiin typen poolikoko pötsin nestefaasissa ja partikkelifaasissa (partikkelifaasista myös KA, NDF ja ADF) 1, 5 ja 9 h ruokinnasta. Nesteosan poolikoko määritettiin tuorepainon ja tuoreesta näytteestä määritetyn typpipitoisuuden perusteella. Kiinteän osan poolikoko määritettiin kuiva-ainemäärän ja kuivista näytteistä määritetyn typpipitoisuuden perusteella. Näyte otettiin aina pötsin tyhjennyksen yhteydessä ja käsiteltiin samalla tavalla kuin näyte II sillä erotuksella, että III-näytteessä bakteerimassa yhdistettiin muun partikkeliosan kanssa. Nestenäyte käsiteltiin ja pakastettiin kuten Näyte II, mutta jatkokäsittelyssä vain bakteerit ja sentrifugoitu nesteosa otettiin talteen.

Kaikki käsitellyt näytteet punnittiin, pakastettiin ja sentrifugoitua nesteosaa lukuunottamatta myös pakkaskuivattiin. Lisäksi näytteiden II ja III partikkeli- ja bakteerinäytteet kuivattiin yön yli (50 °C) ja punnittiin kuiva-aineen laskemista varten. Kaikista näytteistä määritettiin kokonaistyyppi ja lisäksi alkueläinnäytteistä ja näytteistä II ^{15}N osuus kokonaistypestä. Partikkelinäytteistä määritettiin fraktiot B_2 , B_3 , C ja lisäksi näytteistä II ^{15}N osuus näistä fraktioista. Näytteiden III partikkeliosista analysoitiin lisäksi NDF, ADF ja INDF. Nestenäytteistä analysoitiin ammoniumtyppi ja ^{15}N osuus ammoniumtypestä. Lisäksi näytteiden II nestenäytteistä analysoitiin fraktio B_1 , ^{15}N osuus B_1 -fraktiossa sekä koboltti. Yhteenveto pötsin ruokasulanäytteiden määrästä ja jaottelusta on esitetty kuviossa 1.



Kuvio 1. Pötsin ruokasulanäytteet ja niiden analysointi.

Leco-N = kokonaistypen analyysi Leco FP-428 analysaattorilla. N-tuoreesta = kokonaistypen analyysi Kjeldahl-menetelmällä.

2.4 Kemialliset analyysit

Kokonaistypen pitoisuus pötsin ruokasulanäytteistä mitattiin kahdella eri menetelmällä. Liukoisten fraktioiden mittaukset tehtiin 20 ml näytteistä Kjeldahlin menetelmällä käyttäen katalyyttina kuparisulfaattia (CuSO_4). Pötsin liukenemattomasta fraktiosta määritettiin kokonaistyyppi käyttämällä Dumas-analysaattoria (Leco FP-428; Leco Corporation, St Joseph, MI). Kuivissa näytteissä ^{15}N osuus kokonaistypestä määritettiin massaspektrometrillä. Näytettä punnittiin tinakapseliin siten että näytteessä laskettiin olevan 100 μg typpeä. Tinakapseli suljettiin, pyöriteltiin palloksi ja analysoitiin Roboprep-CN analysaattorilla (Europa Scientific Ltd., Crewe, UK), joka oli yhteydessä VG 622 massaspektrometriin (VG Micromass Ltd., Winsford, UK). Määritettäessä ^{15}N osuutta liukoisesta typpifraktiosta näyte käsiteltiin 1 ml 6 normaalia suolahappoa (HCl), jolloin liuoksen pH laski tasolle 3 ja typen haihtuminen saatiin estettyä ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ $\text{pK}_a = 9,02$). Tämän jälkeen näytettä punnittiin 100 μl tinakapseliin, joka sisälsi noin 10 mg nestettä absorboivaa Cromosorbia. Näytettä haihdutettiin 60 °C, lisättiin taas 100 μl näytettä ja haihdutettiin. Tämä toistettiin, kunnes näytettä oli lisätty yhteensä 600 μl . Tällöin ^{15}N määrä näytteessä oli tavoiteltu 100-150 μg . Analysointi tapahtui massaspektrometrillä kuten kuivissa näytteissä.

Ammoniumtypen määrittäminen pötsinesteestä tapahtui kolorimetrisesti (McCullough 1967). Vastaavasti ^{15}N osuus ammoniumtypestä määritettiin haihdutusmenetelmän avulla. Pötsinäytteen nesteosaa pipetoitiin 80 ml, 250 ml pulloon. Pullon suuaukkoon (halkaisija 9 mm) laitettiin lasivillatuppo (Whatman GF/D) ruostumattoman teräslangan varaan. Ammoniumtypen haihtumisen varmistamiseksi näytteeseen lisättiin 0,7 ml 6 molaarista natriumhydroksidia (NaOH), jolloin pH nousi tasolle 12. Ammoniumtyppi saatiin tarttumaan lasivillatuppoon lisäämällä siihen 8 μl 1 N rikkihappoa (H_2SO_4). Pullo suljettiin välittömästi, pidettiin huoneenlämmössä yön yli ja haihdutettiin yhteensä 100 μg ammoniumtyppeä lasivillatuppoon. Seuraavana päivänä lasivillatuppoa kuivattiin 2 h (60 °C), siirrettiin ammoniumtyppi tinakapseleihin ja analysoitiin ^{15}N . Pötsinäytteen B_1 -fraktio analysoitiin käyttämällä trikloorietikkahappoa (TCA). Menetelmässä valkuainen saostetaan, mutta peptidit ja aminohapot eivät saostu ja kuuluvat siksi NPN-fraktioon (Licitra ym. 1996). Näytettä punnittiin 52,5 ml, lisättiin 7,5 ml 40 % TCA ja annettiin saostua yön yli. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin (22 Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Germany) (10 000 x g 15 min). Erottunut sakka huuhdeltiin vielä uudelleen 40 ml 5 % TCA ja sentrifugoitiin. Tämä toistettiin kahteen kertaan. Typen määrä määritettiin Kjeldahl-menetelmän avulla. Määritettäessä ^{15}N

osuutta B₁-fraktiossa sentrifugoitu sakka pakkaskuivattiin, siirrettiin tinakapseleihin ja analysoitiin. Pötsinäytteessä neutraalidetergenttiin ja happodetergenttiin liukenematon proteiini määritettiin Licitran ym. (1996) osoittamalla tavalla lukuun ottamatta uuttoa, jossa käytettiin ANKOM 220 kuituanalysointia (ANKOM Technology, Fairport NY). Pötsinäytteen A-fraktio laskettiin erotuksena ($A\text{-fraktio} = N - (B_1 + \text{liukenematon } N)$).

Säilörehun liukoisesta fraktiosta määritettiin ammoniumtyppi tuoreesta näytteestä (McCullough 1967). Vastaavasti ¹⁵N osuus ammoniumtyypistä määritettiin samalla tavoin kuin pötsin nestefaasista. Säilörehun B₁-fraktio määritettiin TCA-menetelmällä, jossa näyte käsiteltiin 10 % TCA:lla. Seuraavana päivänä näyte suodatettiin (Whatman 541), pakkaskuivattiin yön yli, jauhettiin ja analysoitiin Leco FP-428 typpianalysointilaitteella ja ¹⁵N-analysointilaitteella. Säilörehun liukenematon fraktio määritettiin Leco FP-428 N analysointilaitteella ja ¹⁵N osuus liukenemattomasta fraktiosta kuten pötsinäytteen liukenemattomasta fraktiosta. Säilörehun A-fraktio laskettiin erotuksena. Pötsinesteen virtauskinetiikan laskentaa varten pötsin nesteestä määritettiin koboltti. Koboltti suodatettiin selluloosafiltterin (Whatman 1) läpi ja analysoitiin plasma-spektrometrillä (Iris Advantage, Thermo Jarrel Ash, MA, USA).

2.5 Tulosten laskenta

Säilörehun liukoisen ja liukenemattoman typpifraktion sekä ammoniumtyypin ¹⁵N rikastuminen (mg) yli taustarikastumisen ennen pötsiin annostelua voitiin laskea, kun tiedettiin kunkin fraktion kokonaistypen määrä sekä ¹⁵N % näissä fraktiossa.

Pötsin poolikoko määritettiin pötsin tyhjennyksen yhteydessä otetuista näytteistä. Nesteosan typen poolikoko määritettiin nesteen tuorepainon ja tuoreesta näytteestä määritetyn typpipitoisuuden perusteella. Kiinteän osan poolikoko määritettiin kuiva-ainemäärän ja kuiva-aineesta määritetyn typpipitoisuuden perusteella. Pötsin poolikoko määritettiin kullakin jaksolla kolmena eri ajankohtana. Mallintamisen havaintoaineistossa käytettiin näiden kolmen mittauksen keskiarvoa.

Typellisten yhdisteiden metaboliareittejä mallinnettaessa havaintoaineistona käytettiin pötsin ammoniumtyypen, bakteerityypen, alkueläintypen, liukenemattoman typen ja valkuaisen C-fraktion ¹⁵N-rikastumisen perusteella laskettua taustarikastumisen ylittävää poolikokoa.

Havaintoaineiston perusteella rakennettiin ammoniumtypen (Malli 1), säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) (Malli 2) ja säilörehun liukenemattoman typen (Malli 3) metaboliareittejä kuvaavat mallit. Kaseiinin tuloksia ei käsitelty tässä yhteydessä. Kaseiinin ^{15}N annoskoko oli niin pieni, että sen osalta ei voitu tehdä samoja mittauksia kuin muissa käsittelyissä. Ammoniumtypen ja säilörehun SNAN:n malleissa havaintoaineisto käsitti ammoniumtypen, bakteeritypen ja alkueläintypen ^{15}N rikastumisen (mg). Säilörehun liukenemattoman typen mallissa havaintoaineistoon lisättiin edellisten lisäksi liukenemattoman typen ja valkuaisen C-fraktion ^{15}N rikastuminen (mg).

Pötsin ammoniumtypen ^{15}N määrä (mg) kussakin aikapisteessä laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 1: $\text{Ammonium-}^{15}\text{N}_i = \text{Amm_N}_i \times \text{RUOK} \times \text{NH}_3\text{N-}^{15}\text{N-\%} \times 10$, jossa

$\text{Ammonium-}^{15}\text{N}$ = Ammoniumtypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) pötsissä ajankohtana i ammoniumtypen annostelun jälkeen, Amm_N_i = ammoniumtypen määrä (g/kg) pötsin tuoreesta näytteestä (II näyte), RUOK = pötsin ruokasulan määrä (kg), $\text{NH}_3\text{N-}^{15}\text{N-\%}$ = ammoniumtypen ^{15}N pitoisuus ($^{15}\text{N}/\text{N}$).

Bakteeri- ja alkueläintypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) voitiin laskea, kun ensin laskettiin liukenemattoman typen määrä pötsin tyhjennyksen yhteydessä otetuista näytteistä (III näyte). Pötsin liukenemattoman typen määrä (g) laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 2: $\text{Liukenematon_N} = \text{Liuk_N} \times \text{KA_POL}$, jossa

Liukenematon_N = Liukenemattoman typen määrä pötsissä (g), Liuk_N = Liukenemattoman typen pitoisuus (g/kg) pötsin tyhjennysnäytteen partikkelifraktiossa (III näyte) ja KA_POL = partikkelifraktion poolikoko pötsissä (kg).

Liukenemattoman typen määrästä estimoitiin bakteeri-, alkueläin- ja liukenemattoman rehutypen osuudet Exelin SOLVERilla. Estimointi tehtiin erikseen ammoniumtypen ja SNAN:n malleille. Liukenemattoman typen metaboliaa tutkittaessa bakteerien, alkueläinten ja liukenemattoman rehutypen osuudet laskettiin kahden edellämainitun mallin keskiarvona. Ammoniumtypen mallissa Exelin SOLVER estimoi bakteerien, alkueläinten ja liukenemattoman rehutypen osuudeksi 0,539; 0,272 ja 0,190 (g/g) pötsin liukenemattomasta tyydestä. Säilörehun SNAN:n mallissa vastaavat osuudet olivat 0,614; 0,233 ja 0,153 ja säilörehun liukenemattoman typen mallissa 0,576; 0,252 ja 0,172.

Pötsin bakteeritypen ^{15}N määrä (mg) kussakin aikapisteessä laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 3: Ammoniumtypen metabolia: $\text{Bakteeri}_{^{15}\text{N}_i} = 0,539 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Bakt-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 4: Säilörehun SNAN:n metabolia: $\text{Bakteeri}_{^{15}\text{N}_i} = 0,614 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Bakt-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 5: Säilörehun liukenemattoman typen metabolia: $\text{Bakteeri}_{^{15}\text{N}_i} = 0,576 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Bakt-}^{15}\text{N}_i$, joissa

$\text{Bakteeri}_{^{15}\text{N}_i}$ = Bakteeritypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) pötsissä ajankohtana i annostelun jälkeen, Liukenematon_N = Liukenemattoman typen määrä pötsissä (g) ja $\text{Bakt-}^{15}\text{N}_i$ = ^{15}N pitoisuus yli taustapitoisuuden (mg/g typpeä) pötsin bakteereissa ajankohtana i.

Pötsin alkueläintypen ^{15}N määrä (mg) kussakin aikapisteessä laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 6: Ammoniumtypen metabolia: $\text{Alkueläin}_{^{15}\text{N}_i} = 0,272 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Alk-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 7: Säilörehun SNAN:n metabolia: $\text{Alkueläin}_{^{15}\text{N}_i} = 0,233 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Alk-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 8: Säilörehun liukenemattoman typen metabolia: $\text{Alkueläin}_{^{15}\text{N}_i} = 0,252 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{Alk-}^{15}\text{N}_i$, joissa

$\text{Alkueläin}_{^{15}\text{N}_i}$ = Alkueläintypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) pötsissä ajankohtana i annostelun jälkeen, Liukenematon_N = Liukenemattoman typen määrä pötsissä (g) ja $\text{Alk-}^{15}\text{N}_i$ = ^{15}N pitoisuus yli taustapitoisuuden (mg/g typpeä) pötsin alkueläimissä ajankohtana i.

Pötsin liukenemattoman rehutypen ^{15}N määrä (mg) kussakin aikapisteessä laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 9: Ammoniumtypen metabolia: $\text{LiukR}_{^{15}\text{N}_i} = 0,190 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{LiukR-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 10: Säilörehun SNAN:n metabolia: $\text{LiukR}_{^{15}\text{N}_i} = 0,153 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{LiukR-}^{15}\text{N}_i$

Yhtälö 11: Säilörehun liukenemattoman typen metabolia: $\text{LiukR}_{^{15}\text{N}_i} = 0,172 \times \text{Liukenematon_N} \times \text{LiukR-}^{15}\text{N}_i$, joissa

$\text{LiukR}_{^{15}\text{N}_i}$ = Liukenemattoman rehutypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) pötsissä ajankohtana i annostelun jälkeen, Liukenematon_N = Liukenemattoman typen määrä pötsissä (g) ja $\text{LiukR-}^{15}\text{N}_i$ = ^{15}N pitoisuus yli taustapitoisuuden (mg/g typpeä) pötsin partikkeleissa ajankohtana i.

Pötsin liukenemattoman typen ^{15}N määrä (mg) laskettiin kussakin aikapisteessä laskemalla yhteen bakteeritypen, alkueläintypen ja liukenemattoman rehutypen ^{15}N määrät (mg). Pötsin C-fraktion ^{15}N määrä (mg) kussakin aikapisteessä laskettiin seuraavasti:

Yhtälö 12: Säilörehun liukenemattoman typen metabolia: $C_{-15}N_i = 0,172 \times \text{Liukenematon}_N \times C \times {}^{15}N_i - C$, jossa

$C_{-15}N_i$ = Säilörehun liukenemattoman ja hajoamattoman rehutypen ${}^{15}N$ taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) pötsissä ajankohtana i liukenemattoman typen annostelun jälkeen, Liukenematon_N = Liukenemattoman typen määrä pötsissä (g), C = Rehuvalkuaisen C-fraktion pitoisuus (g/g) näytteessä ja ${}^{15}N_i - C$ = Happodetergenttiin liukenemattoman ${}^{15}N$ pitoisuus yli taustapitoisuuden (mg/g tyyppiä) pötsin partikkeleissa.

Pötsinesteen kobolttipitoisuuden laimenemiseen perustuva nesteen virtausnopeus estimoitiin WinSAAM -ohjelmaa hyödyntäen. Merkkiaineena käytetty LiCoEDTA analysoitiin pötsin nestefraktiosta (näytteistä II). Havaintoaineistona käytettiin seuraavaa yhtälöä:

Yhtälö 13: $Co_i = b_1 \times e^{(-b_2 \times i)}$

Co_i = Kobolttin pitoisuus kussakin aikapisteessä i , LiCoEDTA:n annostelun jälkeen, b_1 = Pitoisuus ajanhetkellä nolla, b_2 = Virtausvakio (1/h) ja i = Ajankohta (tuntia) annostelusta. WinSAAM estimoi nesteen virtausvakioksi $0,224 \text{ h}^{-1}$.

Havaintoaineiston perusteella WinSAAM -ohjelmistolla estimoitiin parhaimmat parametriarvot kullekin mallille. Kuviot mallien 1, 2 ja 3 metaboliareiteistä piirrettiin POWERSIM-ohjelmalla ja rehuvalkuainen jaettiin eri osafraktioihin CNCPS-mallin mukaisesti. Mallien 1, 2 ja 3 todenmukaisuutta arvioitiin suhteellisen keskihajonnan (FSD, fractional standard deviation) avulla, joka kuvaa kunkin fraktion virhetermin suuruutta. Mallien yliparametrisoitumista arvioitiin parametriarvojen keskinäisten korrelaatioiden avulla. Tässä tutkimuksessa käytetty säilörehun pesuteknikka ei täysin erottanut liukoista fraktiota liukenemattomasta, sillä myös säilörehun liukenematon fraktio sisälsi ammoniumtyyppiä, A-fraktiota ja B_1 -fraktiota. Tämä otettiin tulosten mallinnuksessa huomioon siten, että liukoiset tyypifraktiot olivat mallissa 3 mukana kun parametriarvoja estimoitiin. Mallia sovitettiin koko havaintoaineistoon, koska havaintoaineistosta ei voitu laskennallisesti poistaa liukoisten fraktioiden vaikutuksia. Kun luotettavin malli oli löydetty, voitiin mallintaa ainoastaan liukenemattomien tai liukoisten fraktioiden metaboloitumista. Lopulta valmiin ja parametrisoidun mallin avulla voidaan arvioida minkä tahansa tyypifraktion metaboloitumista, kun asetetaan muiden fraktioiden tilamuuttujien arvot nolliksi.

3. Tulokset

3.1 Rehujen kemiallinen koostumus

Kaikki kokeessa käytetyt rehut analysoitiin ja lisäksi säilörehuista määritettiin säilönnällinen laatu (taulukko 4). Liukoiseen ja liukenemattomaan fraktioon jaettu ¹⁵N-säilörehu sisälsi 571 g/kg KA NDF-kuitua ja 121 g/kg KA raakavalkuaista. Vastaavasti timoteisäilörehu sisälsi 528 g/kg ka NDF-kuitua ja 138 g/kg KA raakavalkuaista. Väkirehu edusti tyypillistä rypsi-vilja seosta, jossa oli 238 g/kg NDF-kuitua ja 184 g/kg KA raakavalkuaista.

Pötsiin annostellun ¹⁵N-säilörehun valkuainen jaettiin eri osafraktioihin Licitran ym. (1996) mukaan sillä erotuksella, että ammoniumtyppi ja valkuaisen A-fraktio ovat esitetty erillisinä fraktioina (taulukko 5). Liukoinen fraktio sisältää suurimmaksi osaksi A-fraktiota. Lisäksi suurin osa A-fraktiosta on aminohappoja ja lyhytketjuisia peptidejä. Säilörehun liukenematon fraktio sisältää fraktiot B₂, B₃ ja C. Tässä kokeessa säilörehun pesutekniikka ei täysin pystynyt erottamaan liukoista fraktiota liukenemattomasta ja siksi tämä fraktio sisälsi huomattavan osuuden myös valkuaisen liukoisia fraktioita A ja B₁. Merkkiaineen %-osuus rehuvalkuaisen eri osafraktioissa vaihteli 5,56-3,55 % välillä ja oli suurin liukoissa fraktioissa ja vastaavasti pienin valkuaisen C-fraktiossa.

Taulukko 4. Timoteisäilörehun, ¹⁵N merkatun säilörehun ja väkirehuseoksen kemiallinen koostumus.

Nimike	¹⁵ N-säilörehu ¹	Timoteisäilörehu ²	Väkirehu
Kuiva-aine, g/kg	219	280	893
Kuiva-aineessa, g/kg			
Tuhka	77	78	81
N	19,31	22,0	29,4
NDF	571	528	238
iNDF ³	48	41	69
dNDF ⁴	916	922	711

¹ Säilönnällinen laatu: pH 4.0; Kuiva-aineessa (g/kg): Maitohappo 48, Etikkahappo 16, Propionihappo 0.3, Voihappo 3.3, Sokeri 19; Ammoniumtypen osuus kokonaistypestä (g/kg): 57.

² Säilönnällinen laatu: pH 4.0; Kuiva-aineessa (g/kg): Maitohappo 62, Etikkahappo 17, Propionihappo 0.8, Voihappo 0.8, Sokeri 59; Ammoniumtypen osuus kokonaistypestä (g/kg): 80.

³ Sulamaton NDF määritettiin 12 pv:n in situ pötsi-inkubaation avulla.

⁴ Sulavan NDF-fraktion osuus (g kg⁻¹) NDF:stä.

Taulukko 5. Kokeessa käytetyn ^{15}N -säilörehun määrä, kemiallinen koostumus ja jakautuminen valkuaisen eri osafraktioihin.

Nimike	Liukoinen fraktio	Liukenematon fraktio
Tuore paino, kg	11,286	5,750
Kuiva-ainetta, g/kg	ND	246
N, g/kg DM	ND	15,6
N-fraktiot, g/kg N		
Ammoniumtyppi	67	27
A ¹	913	325
B ₁	20	40
B ₂	ND	391
B ₃	ND	165
C	ND	51
^{15}N osuus (%) N-fraktioista		
Kokonaistyyppi	4,90	5,01
Ammoniumtyppi	5,15	4,72
A + B ₁	4,88	5,56
B ₂	ND	4,74
B ₃	ND	4,89
C	ND	3,55

¹A-fraktio käsittää ei-ammonium ei-valkuaisiätyypin.

ND = Ei määritetty

Pötsiin annosteltiin jokaisella koejaksolla 40 g ammoniumsulfaattia, 990 g kaseiinia, 11,286 kg säilörehun liukoista fraktioista tai 5,750 kg säilörehun liukenematonta fraktiota (taulukko 6). Koska ^{15}N -merkkiaine lisättiin koerehuun lannoitteen mukana, rehun valkuaisfraktioissa tapahtui ^{15}N rikastumista jo kasvin kasvun aikana. Ammoniumsulfaatin ja säilörehun liukoisen sekä liukenemattoman fraktion ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ennen pötsiin annostelua asetettiin alkuarvoksi (initial condition) kussakin mallissa, kun laskettiin pötsissä tapahtuvaa ^{15}N rikastumista ajan funktiona.

Taulukko 6. Pötsiin annostellun ammoniumsulfaatin sekä säilörehun liukoisen ja liukenemattoman fraktion tuorepaino, kuivapaino, kokonaistypen määrä sekä ¹⁵N osuus yli taustarikastumisen näissä fraktioissa.

Fraktio	Ammoniumsulfaatti	Liukoinen fraktio	Liukenematon fraktio
Pötsiin annosteltu määrä			
Tuorepaino, kg	0,04	11,286	5,75
Kuivapaino, kg	ND	ND	1,414
Kokonaistyyppi, g	8,52	17,17	22,29
¹⁵ N rikastuminen yli taustarikastumisen, mg			
Kokonaistyyppi	821	840	1116
Ammoniumtyppi	821	59	29
A ¹ + B ₁	ND	781	454
B ₂	ND	ND	412
B ₃	ND	ND	180
C	ND	ND	40

¹A-fraktio käsittää ei-ammonium-, ei-valkuaistypen

ND = Ei määritetty

3.2 Syönti, dieetin sulavuus ja maidontuotanto

Kukin eläin söi koejakson aikana keskimäärin 23,35 kg kuiva-ainetta ja 21,48 kg orgaanista ainetta päivässä (taulukko 7). Koko dieetin NDF-kuidun pitoisuus oli 418 g kg⁻¹ ka ja dieetin raakavalkuaispitoisuus 155 g kg⁻¹ KA. Lehmät tuottivat keskimäärin 33,3 kg (SD 4,59 kg) maitoa päivässä, josta 39,7 g kg⁻¹ oli rasvaa, 31,8 g kg⁻¹ valkuaista ja 48,8 g kg⁻¹ laktoosia.

Taulukko 7. Keskimääräinen eläinkohtainen ravintoaineiden syönti päivässä.

	KA	OM	N	NDF	ADF	PdNDF	INDF
Syönti, kg	23,35	21,48	0,58	9,77	5,37	8,56	1,21
SEM	1,13	1,04	0,03	0,61	0,35	0,56	0,05
Sulavuus	ND	0,725	0,663	0,643	ND	0,766	ND
SEM	ND	0,004	0,014	0,010	ND	0,008	ND

KA = kuiva-aine, OM = orgaaninen aine, N = kokonaistyyppi, NDF = neutraalidetergenttikuitu, ADF = happodetergenttikuitu, pdNDF = potentiaalisesti sulava NDF, INDF = sulamaton NDF

SEM = keskiarvon keskivirhe, ND = Ei määritetty

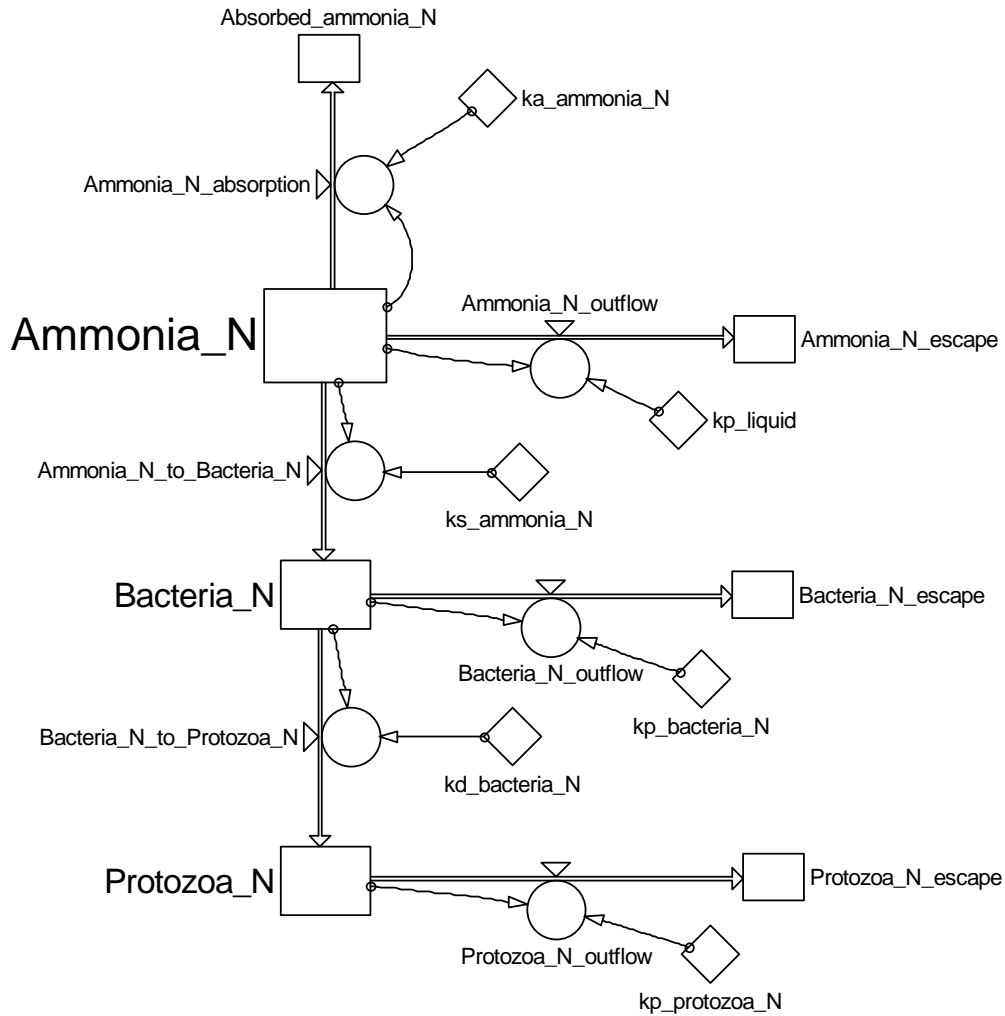
3.3 Dynaamisen mallin rakenne ja toiminta

Tässä tutkimuksessa rakennetut dynaamiset mallit käsittelivät säilörehun tyypellisten yhdisteiden määrää ja kinetiikkaa pötsin kuudessa eri tyypipoolissa: ¹NH₄⁺-N, ²pötsin bakteeri-N, ³pötsin alkueläin-N, ⁴säilörehun SNAN, ⁵säilörehun liukenematon ja potentiaalisesti hajoava valkuaisfraktio (B₂ ja B₃) sekä ⁶säilörehun liukenematon ja hajoamaton valkuaisfraktio (C-fraktio). Dynaamisten mallien avulla mallinnettiin ammoniumtypen, säilörehun liukoisen typen ja säilörehun liukenemattoman typen metabolia sekä ulosvirtaus pötsistä.

3.3.1 Ammoniumtypen metabolia.

Ammoniumtyppi siirtyi pötsistä ulos joko ulosvirtauksen tai imeytymisen kautta neljällä eri tavalla (kuvio 2). Ammoniumtyppi imeytyi suoraan pötsin seinämän läpi, virtasi ulos pötsistä ammoniumtypen muodossa pötsin nestefaasin mukana tai syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi, joka virtasi ulos pötsistä bakteeri- ja alkueläintypen muodossa.

Mallissa 1 ammoniumtyppi metaboloitui (imeytyi pötsin seinämän läpi, virtasi ulos pötsistä ja syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi) erittäin nopeasti, sillä metaboliareittien nopeus oli yhteensä 1,217 h⁻¹ (taulukko 8). Ammoniumtyppi imeytyi pötsin seinämän läpi ja syntetisoitui bakteeritypeksi yhtä nopeasti. Tässä mallissa bakteeritypen ja alkueläintypen ulosvirtausnopeuksiksi on arvioitu 0,051 ja 0,031 h⁻¹. Alkueläimet söivät ammoniumtyppeä hyödyntäviä pötsin bakteereja nopeudella 0,008 h⁻¹. Nesteen virtausnopeus (0,224 h⁻¹) asetettiin kaikissa malleissa kiinteäksi, koska se oli määritetty koboltin avulla. Kaikkien muiden parametrien arvot olivat muokattavissa. Koska kysymys oli dynaamisesta mallista, WinSAAM estimoi kullekin parametrille parhaiten sopivan arvon.



Kuvio 2. Malli 1. Ammoniumtypen metaboloituminen pötsissä.

Ammonia_N = ammoniumtyppi, Ammonia_N_absorption = ammoniumtypen imeytyminen, ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus (1/h), Absorbed_ammonia_N = pötsistä imeytynyt ammoniumtyppi. Ammonia_N_outflow = ammoniumtypen ulosvirtaus pötsistä, kp_liquid = nesteen virtausnopeus (1/h), Ammonia_N_escape = pötsistä ulosvirrannut ammoniumtypen määrä, Ammonia_N_to_bacteria_N = ammoniumtypen muuttuminen bakteeritypeksi, ks_ammonia_N = ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), Bacteria_N = bakteerityppi, Bacteria_N_outflow = bakteeritypen ulosvirtaus pötsistä, kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), Bacteria_N_escape = ulosvirtaavan bakteeritypen määrä, Bacteria_N_to_protozoa_N = bakteeritypen muuttuminen alkueläintypeksi, kd_bacteria_N = bakteeritypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h). Protozoa_N = alkueläintyyppi, Protozoa_N_outflow = alkueläinten ulosvirtaus pötsistä, kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), Protozoa_N_escape = ulosvirtaavan alkueläintypen määrä.

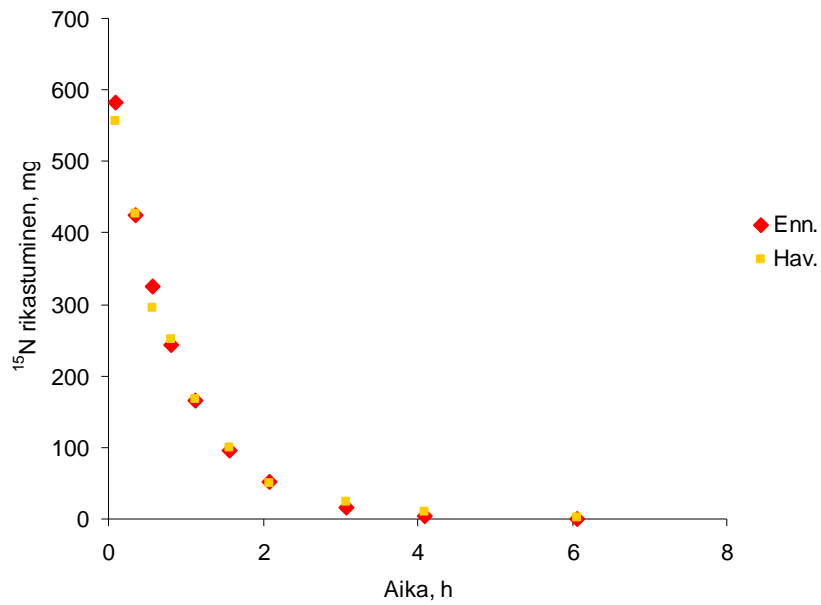
Taulukko 8. Ammoniumtypen metaboliareitit ja parametriarvot.

Parametri	Muoto	Arvo, 1/h	FSD
Malli 1			
kp_liquid	Kiinteä	0,224	ND
ka_ammonia_N	Muokattava	0,479	0,03
ks_ammonia_N	Muokattava	0,514	0,02
kp_bacteria_N	Muokattava	0,051	0,07
kd_bacteria_N	Muokattava	0,008	0,34
kp_protozoa_N	Muokattava	0,031	0,36

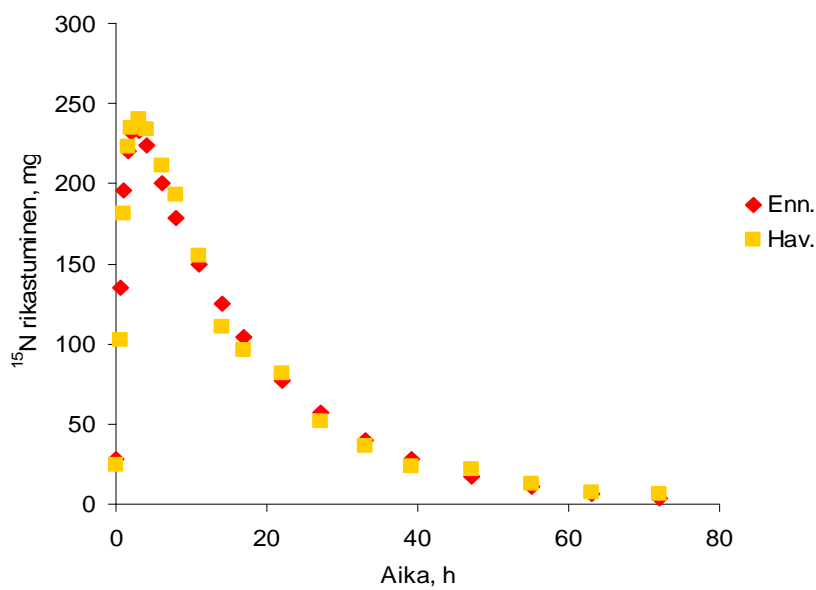
FSD = estimoidun parametriarvon suhteellinen keskihajonta, ND= ei määritetty, kp_liquid = nesteen virtausnopeus pötsistä satakertaan (1/h), ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus pötsistä (1/h), ks_ammonia_N = ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteeritypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h).

Ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko (mg) oli suurimmillaan heti pötsiin annostelun jälkeen, koska ammoniumtyyppi metaboloitui nopeasti pötsissä eikä ammoniumtypen pooliin virrannut ^{15}N merkattua ammoniumtyppeä mistään muusta poolista (kuvio 3). Ammoniumtypen metabolia pötsissä oli erittäin nopeaa, sillä sitä imeytyi sellaisenaan pötsin seinämän läpi ja oli toisaalta välittömästi pötsimikrobien käytettävissä mikrobivalkuaisen synteesiin. Ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko laski lähelle taustarikastumisen arvoa jo neljän tunnin kuluttua pötsiin annostelusta, jolloin lähes kaikki merkattu ammoniumtyyppi oli hävinnyt pötsistä tai käytetty mikrobivalkuaisen synteesiin. Malli 1 ennusti kokeessa havaittuja arvoja erinomaisesti aikavälillä 0-8 tuntia.

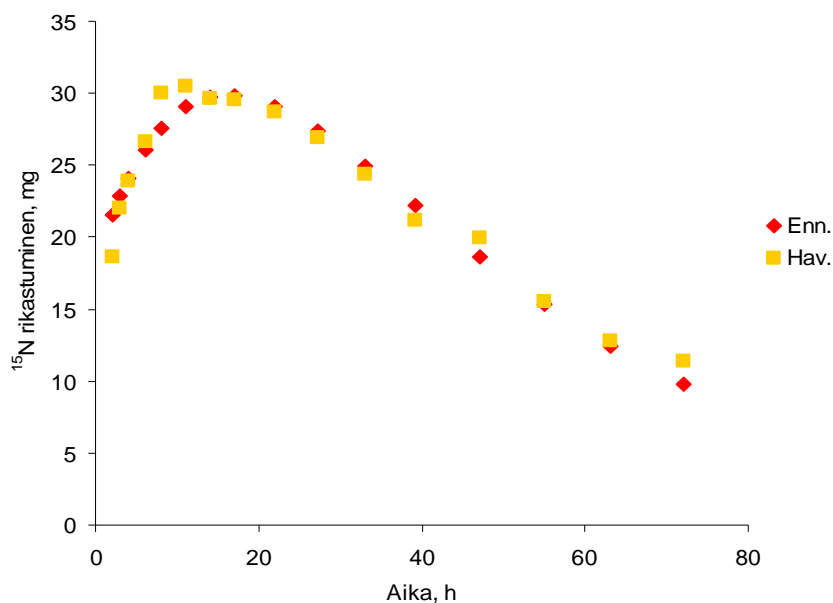
Pötsin bakteerien ^{15}N -poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa noin kolmen tunnin kuluttua ^{15}N -ammoniumtypen annostelusta, jonka jälkeen poolikoko laski hitaasti (kuvio 4). Merkkiaineen poolikoko saavutti huippuarvonsa pötsin bakteereissa hitaammin kuin ammoniumtypen poolissa, koska merkattu ^{15}N -ammomiumtyyppi siirtyi ammoniumtypen poolista pötsin bakteereihin samalla kun bakteerit käyttivät ammoniumtyppeä mikrobivalkuaisen synteesiin. Bakteerien ^{15}N -poolikoko laski, koska mikrobivalkuaisen synteesin saatavilla olevan ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko laski nopeasti ja samaan aikaan mikrobimassaa virtasi pötsistä satakertaan. Malli 1 ennusti pötsin bakteerien metabolian erinomaisesti aikavälillä 0-80 tuntia.



Kuvio 3. Ammoniumtypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 4. Pötsin bakteerien ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 5. Pötsin alkueläinten ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 1 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.

Alkueläinten ^{15}N -poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa noin 11 tunnin kohdalla ^{15}N -ammoniumtypen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 5). Vain pieni osa markatusta ^{15}N -ammoniumtypestä siirtyi pötsin alkueläimiin, sillä alkueläimet söivät pötsin bakteereja nopeudella $0,008 \text{ h}^{-1}$, joka oli huomattavasti hitaampaa kuin bakteeritypen ulosvirtaus ($0,051 \text{ h}^{-1}$) pötsistä. Alkueläinten ^{15}N -poolikoko laski hitaasti, sillä alkueläimet hävisivät pötsistä ainoastaan ulosvirtauksen ($0,031 \text{ h}^{-1}$) kautta. Tässä mallissa ^{15}N -poolikoko saavutti huippuarvon myöhemmin, kuin kokeessa oli havaittu. Malli 1 ennustaa havaittuja arvoja hyvin alkueläinten ^{15}N -poolikoon huippuarvon jälkeen aikavälillä 10-80 tuntia.

Parametriarvojen väliset korrelaatiot olivat voimakkaampia alkueläinten metaboliaan liittyvissä parametreissa kuin mallissa 1 keskimäärin (taulukko 9). Bakteerien ulosvirtausnopeus korreloi melko voimakkaasti alkueläinten bakteeritypen syöntinopeuden ($-0,76$) kanssa sekä alkueläinten ulosvirtausnopeuden ($-0,72$) kanssa. Myös alkueläinten bakteeritypen syöntinopeus korreloi voimakkaasti alkueläinten ulosvirtausnopeuden ($0,91$) kanssa.

Mallin 1 mukaan 38 % ammoniumtypestä imeytyi suoraan pötsin seinämän läpi. Yhteensä 44 % ammoniumtypestä syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi, joka virtasi bakteeri- ja alkueläintypen muodossa satakertaan. Loppuosa (18 %) ammoniumtypestä virtasi nestefaasin mukana satakertaan (taulukko 10).

Taulukko 9. Mallissa 1 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.

Parametri	ka_ammonia_N	ks_ammonia_N	kp_bacteria_N	kd_bacteria_N	kp_protozoa_N
ka_ammonia_N	1.00	0.07	-0.40	0.17	0.16
ks_ammonia_N	0.07	1.00	0.38	-0.21	-0.19
kp_bacteria_N	-0.40	0.38	1.00	-0.76	-0.72
kd_bacteria_N	0.17	-0.21	-0.76	1.00	0.91
kp_protozoa_N	0.16	-0.19	-0.72	0.91	1.00

ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus pötsistä (1/h), ks_ammonia_N = ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteeritypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h).

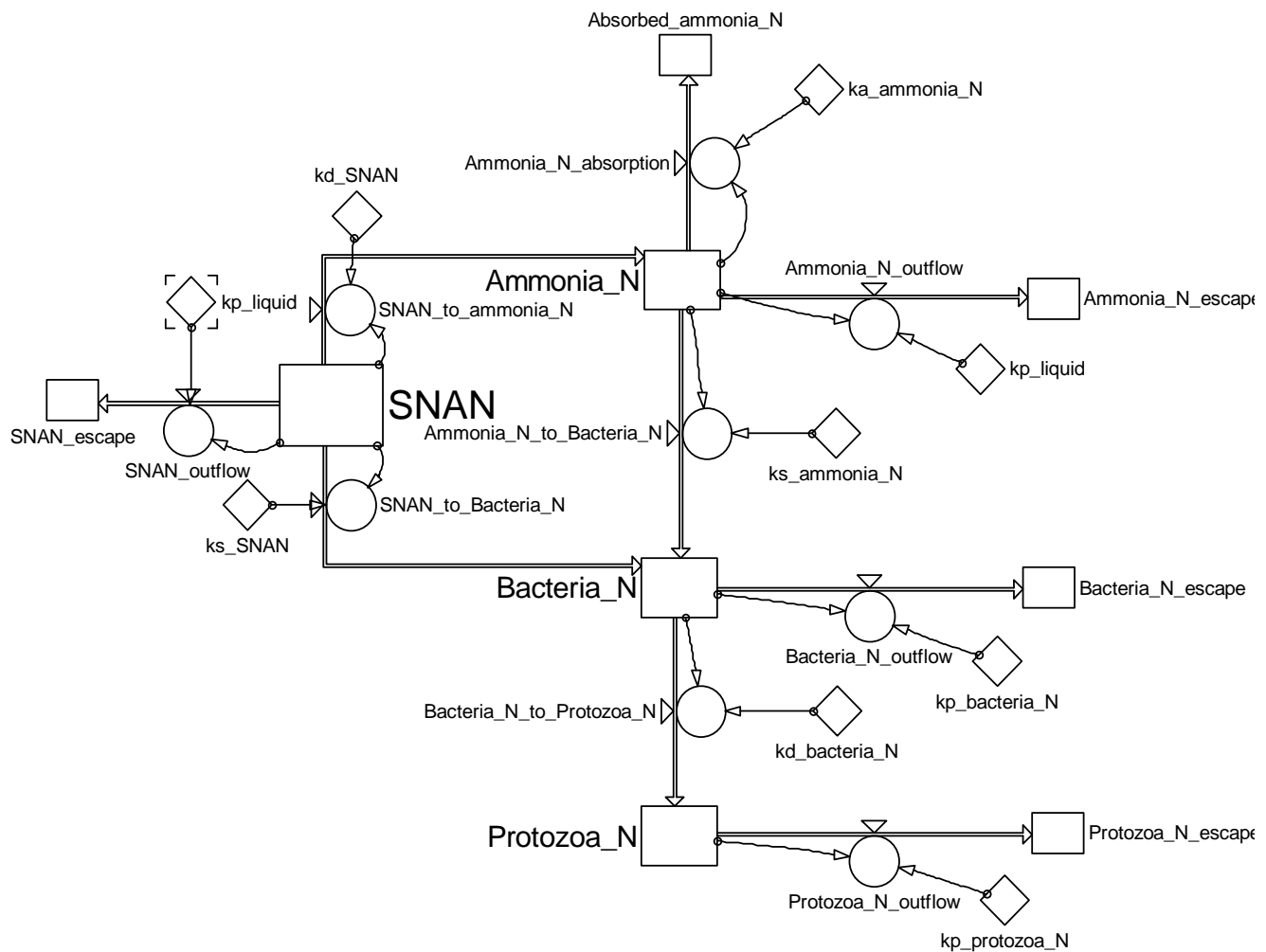
Taulukko 10. Ammoniumtypen simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.

Ammoniumtypen suhteellinen hävikki pötsistä, %	
Kulkeutumisreitti	
Imeytyminen ammoniumtyppenä	38
Bakteeritypen ulosvirtaus	35
Alkueläintypen ulosvirtaus	9
Ulosvirtaus nesteessä	
Ammoniumtyppenä	18

3.3.2 Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen metabolia

Säilörehun SNAN siirtyi pötsistä ulos imeytymisen ja ulosvirtauksen kautta viidellä eri tavalla (kuvio 6). Osa SNAN:stä virtasi suoraan ulos pötsistä ja ohitti pötsin hajoamatta. Pötsissä metaboloituva SNAN hajosi joko ammoniumtypeksi tai syntetisoitui suoraan mikrobivalkuaiseksi. Muodostunut ammoniumtyyppi imeytyi pötsin seinämän läpi, virtasi ulos pötsin nestefaasin mukana tai syntetisoitui edelleen mikrobivalkuaiseksi. Ammoniumtypestä ja SNAN:stä syntetisoitunut mikrobivalkuainen virtasi ulos pötsistä bakteeri- ja alkueläintypen muodossa.

Säilörehun SNAN:n metabolia pötsissä oli nopeaa, sillä aminohapot ja peptidit käsittävät suurimman osuuden tästä fraktiosta (taulukko 11). Tässä mallissa SNAN syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi kahta eri reittiä. Suurin osa (62 %) metaboloituvasta SNAN:stä hajosi ammoniumtypeksi nopeudella $0,907 \text{ h}^{-1}$ ja syntetisoitui edelleen bakteeritypeksi, mutta huomattava osa (38 %) syntetisoitui suoraan mikrobivalkuaiseksi nopeudella $0,565 \text{ h}^{-1}$. Koska kaikki ammoniumtypeksi hajonnut SNAN syntetisoitiin mikrobivalkuaiseksi suhteellisen hitaasti ($0,312 \text{ h}^{-1}$), osa ammoniumtypestä ehti imeytyä pötsin seinämän läpi ($0,667 \text{ h}^{-1}$) sekä virrata ulos pötsistä ($0,224 \text{ h}^{-1}$) nestefaasin mukana. Bakteeri- ja alkueläintyyppi virtasivat ulos pötsistä nopeuksilla $0,057$ ja $0,027 \text{ h}^{-1}$. Vain pieni osa SNAN:stä metaboloitui alkueläintypeksi.



Kuvio 6. Malli 2. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) metaboloituminen pötsissä.

SNAN = liukoinen ei-ammoniumtyppi, kp_{liquid} = nesteen virtausnopeus (1/h), SNAN outflow = SNAN:n ulosvirtaus, SNAN escape = ulosvirranneen SNAN:n määrä, SNAN_to_ammonia_N = SNAN:n hajoaminen ammoniumtyypeksi, SNAN_to_bacteria_N = SNAN:n syntetisoituminen bakteeritypeksi, kd_{SNAN} = SNAN:n hajoamisnopeus ammoniumtyypeksi (1/h), ks_{SNAN} = SNAN:n synteessinopeus bakteeritypeksi (1/h), Ammonia_N = ammoniumtyppi, Ammonia_N_absorption = ammoniumtypen imeytyminen, $ka_{ammonia_N}$ = ammoniumtypen imeytymisnopeus (1/h), Absorbed_ammonia_N = pötsistä imeytynyt ammoniumtyppi, Ammonia_N_outflow = ammoniumtypen ulosvirtaus pötsistä, Ammonia_N_escape = pötsistä ulosvirrannut ammoniumtypen määrä, Ammonia_N_to_Bacteria_N = ammoniumtypen muuttuminen bakteeritypeksi, $ks_{ammonia_N}$ = ammoniumtypen synteessinopeus bakteeritypeksi (1/h), Bacteria_N = bakteerityppi, Bacteria_N_outflow = bakteeritypen ulosvirtaus pötsistä, $kp_{bacteria_N}$ = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), Bacteria_N_escape = ulosvirtaavan bakteeritypen määrä, Bacteria_N_to_protozoa_N = bakteeritypen muuttuminen alkueläintypeksi, $kd_{bacteria_N}$ = bakteeritypen synteessinopeus alkueläintypeksi (1/h), Protozoa_N = alkueläintyyppi, Protozoa_N_outflow = alkueläinten ulosvirtaus pötsistä, $kp_{protozoa_N}$ = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), Protozoa_N_escape = ulosvirtaavan alkueläintypen määrä.

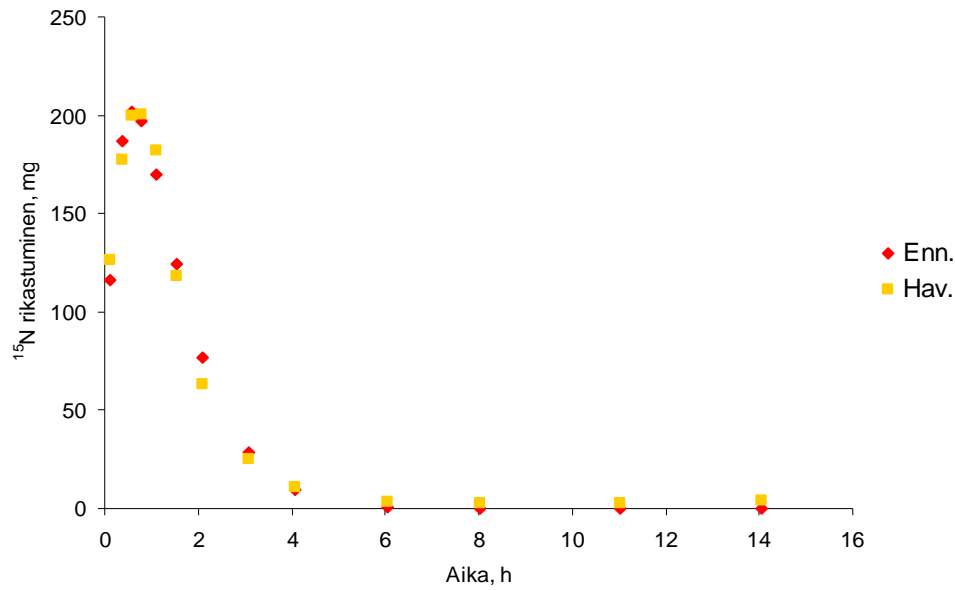
Taulukko 11. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) metaboliareitit ja parametriarvot.

Parametri	Muoto	Arvo, 1/h	FSD
Malli 2			
kp_liquid	Kiinteä	0,224	ND
ka_ammonia_N	Muokattava	0,667	0,08
ks_ammonia_N	Muokattava	0,312	0,21
kp_bacteria_N	Muokattava	0,057	0,07
kd_bacteria_N	Muokattava	0,005	0,58
kp_protozoa_N	Muokattava	0,027	0,47
kd_SNAN	Muokattava	0,907	0,07
ks_SNAN	Muokattava	0,565	0,10

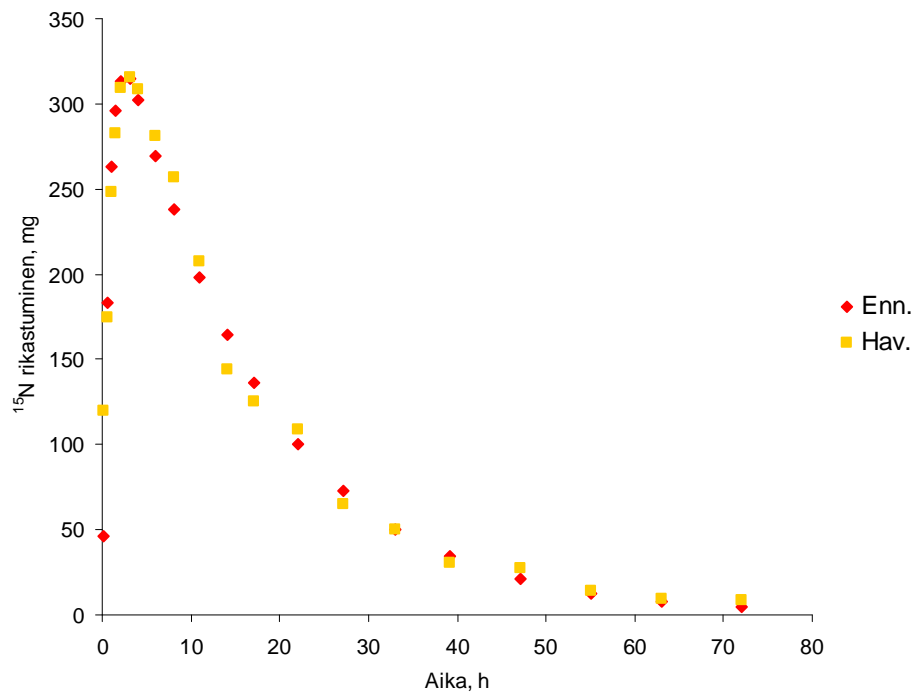
FSD = estimoidun parametriarvon suhteellinen keskihajonta, ND = ei määritetty, kp_liquid = nesteen virtausnopeus pötsistä satakertaan, ka_ammonia_N = Ammoniumtypen imeytymisnopeus pötsistä, ks_ammonia_N = ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteeritypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_SNAN = SNAN:n hajoamisnopeus ammoniumtypeksi (1/h), ks_SNAN = SNAN:n synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h).

Tässä mallissa ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko (mg) pötsissä saavutti huippuarvonsa noin 50 minuutin kuluttua SNAN:n pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 7). Ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko saavutti huippuarvonsa myöhemmin kuin mallissa 1, koska SNAN täytyi ensin hajottaa ammoniumtypeksi. Ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko laski jyrkästi, sillä ammoniumtyppi käytettiin nopeasti mikrobivalkuaisen synteesiin ja osa ammoniumtypestä hävisi pötsistä imeytymisen ja ulosvirtauksen kautta. Ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko laski lähelle nollaa noin kuuden tunnin jälkeen SNAN:n annostelusta. Tämä oli noin kaksi tuntia myöhemmin kuin mallissa 1. Malli 2 ennusti ammoniumtypen metabolian erittäin tarkasti aikavälillä 0-16 tuntia.

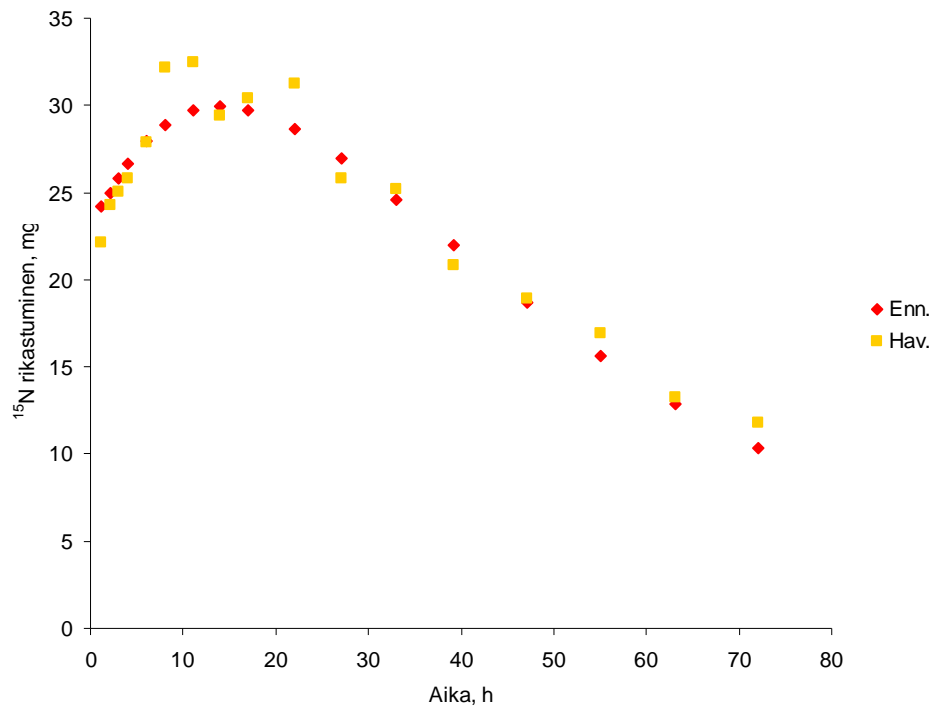
Pötsin bakteerien ^{15}N -poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa noin kolmen tunnin kuluttua SNAN:n pötsiin annostelun jälkeen, mikä oli yhtä nopeasti kuin mallissa 1 (kuvio 8). Tämä tarkoittaa sitä, että säilörehun SNAN metaboloitui mikrobivalkuaiseksi samalla nopeudella kuin puhdas ammoniumtyppi. Malli 2 ennusti pötsin bakteerien metabolian erinomaisesti aikavälillä 0-80 tuntia. Kuten pötsin bakteerien, myös alkueläinten ^{15}N -poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa mallissa 2 yhtä nopeasti kuin mallissa 1 (kuvio 9). Merkkiaineen poolikoon huippuarvo saavutettiin noin 8-11 tunnin kohdalla SNAN:n pötsiin annostelun jälkeen. Alkueläinten ^{15}N -poolikoko laski hitaasti, sillä alkueläimet hävisivät pötsistä ainoastaan ulosvirtauksen ($0,027\text{ h}^{-1}$) kautta. Malli 2 ennusti melko hyvin alkueläinten metabolian aikaväleillä 0-8 tuntia ja 11-80 tuntia. Aikavälillä 8-11 tuntia malli 2 aliarvioi lievästi ^{15}N -poolikoon huippuarvon.



Kuvio 7. Ammoniumtypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 8. Pötsin bakteerien ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 9. Pötsin alkueläinten ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona.

Mallissa 2 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.

Taulukko 12. Mallissa 2 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.

Parametri	ka_ammonia_N	ks_ammonia_N	kp_bacteria_N	kd_bacteria_N
ka_ammonia_N	1.00	0.12	-0.29	0.06
ks_ammonia_N	0.12	1.00	0.29	-0.04
kp_bacteria_N	-0.29	0.29	1.00	-0.76
kd_bacteria_N	0.06	-0.04	-0.76	1.00
kp_protozoa_N	0.05	-0.04	-0.72	0.92
kd_SNAN	0.51	0.49	-0.05	0.00
ks_SNAN	0.11	-0.86	-0.19	-0.02

Parametri	kp_protozoa_N	kd_SNAN	ks_SNAN
ka_ammonia_N	0.05	0.51	0.11
ks_ammonia_N	-0.04	0.49	-0.86
kp_bacteria_N	-0.72	-0.05	-0.19
kd_bacteria_N	0.92	0.00	-0.02
kp_protozoa_N	1.00	0.00	-0.01
kd_SNAN	0.00	1.00	-0.13
ks_SNAN	-0.01	-0.13	1.00

ka_ammonia_N = Ammoniumtypen imeytymisnopeus pötsistä, ks_ammonia_N = ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_bacteria_N = bakteerityypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteerityypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_SNAN = SNAN:n hajoamisnopeus ammoniumtypeksi (1/h), ks_SNAN = SNAN:n synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h).

Kuten mallissa 1, myös tässä mallissa alkueläinten metaboliaan liittyvät parametriarvot korreloivat voimakkaasti keskenään (taulukko 12). Bakteritypen ulosvirtausnopeus korreloi alkueläinten bakteritypen syöntinopeuden ja alkueläintypen ulosvirtausnopeuden kanssa arvoilla -0,76 ja -0,72. Alkueläintypen ulosvirtausnopeus korreloi alkueläinten bakteritypen syöntinopeuden kanssa hyvin voimakkaasti (0,92). Alkueläintypen metabolian lisäksi myös bakteritypen synteesireitit korreloivat keskenään voimakkaasti (-0,86).

Säilörehun SNAN:stä yhteensä 53 % hajosi ammoniumtypeksi. Koska osa ammoniumtypestä syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi, koko SNAN:n fraktiosta 29 % imeytyi ammoniumtyppinä pötsin seinämän läpi ja 10 % virtasi ulos pötsistä ammoniumtypen muodossa (taulukko 13). Yhteensä 49 % SNAN:stä syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi, joka virtasi pötsistä ulos bakteri- ja alkueläintypen muodossa. Lisäksi 13 % SNAN:stä ohitti pötsin hajoamatta.

Taulukko 13. Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.

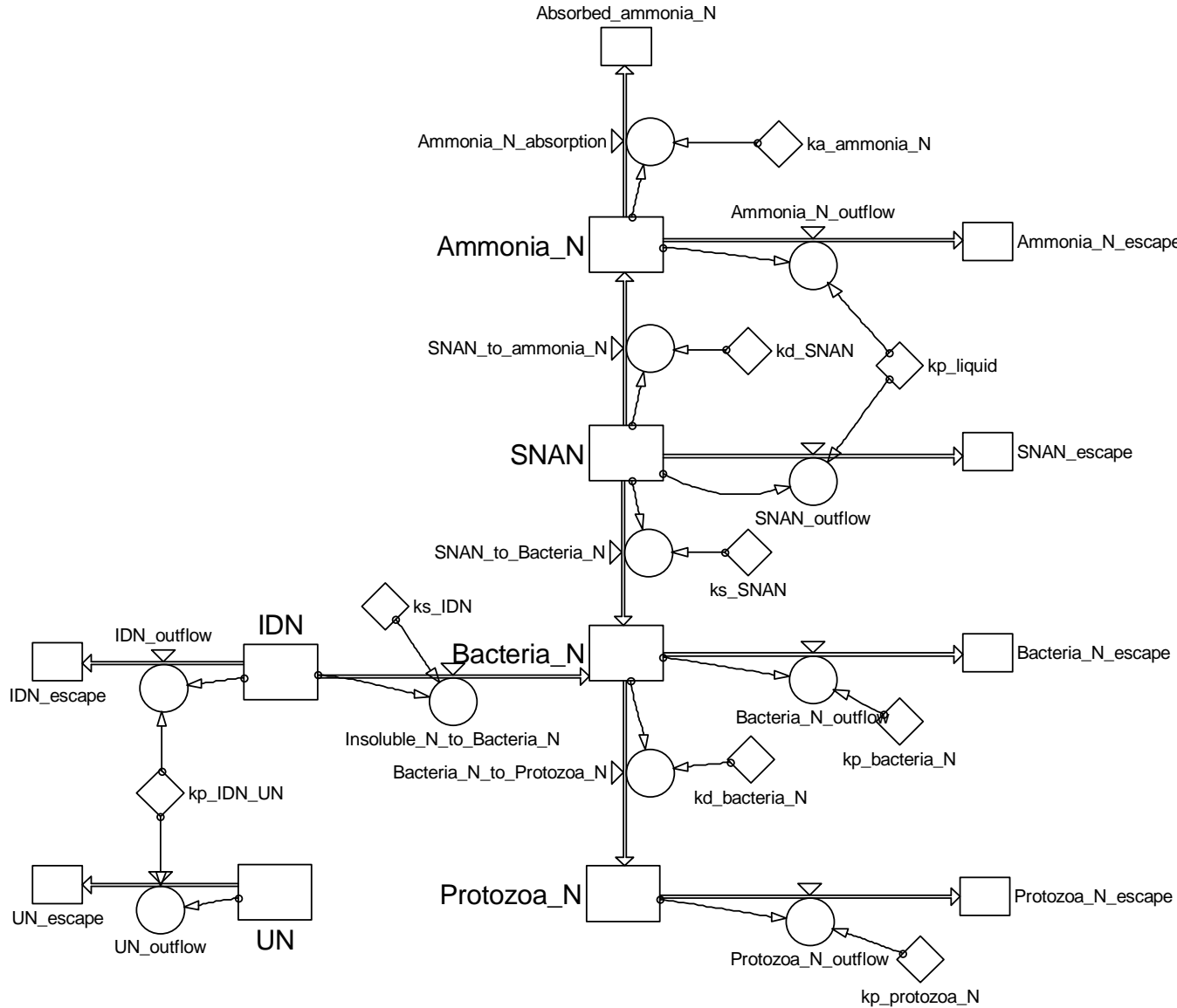
	Säilörehun SNAN:n suhteellinen hävikki pötsistä, %
Kulkeutumisreitti	
Imeytyminen ammoniumtyppinä	29
Bakteritypen ulosvirtaus	42
Alkueläintypen ulosvirtaus	7
Ulosvirtaus nesteessä	
Ammoniumtyppinä	10
SNAN-fraktiona	13

SNAN = Liukoinen ei-ammoniumtypi.

3.3.3 Säilörehun liukenemattoman typen metabolia

Säilörehun liukenematon typpi virtasi pötsistä satakertaan kolmella eri tavalla. Liukenemattoman typen potentiaalisesti hajoamaton C-fraktio virtasi suoraan pötsistä ulos hajoamatta. Potentiaalisesti hajoavista fraktioista (B_2 ja B_3) osa virtasi pötsistä ulos hajoamatta ja osa syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi. Mikrobivalkuaiseksi syntetisoitunut typpi virtasi ulos pötsistä bakteeri- ja alkueläintypen muodossa. Tässä kokeessa säilörehun pesuteknikka ei täysin erottanut liukoista tyyppiä liukenemattomasta ja siksi malli 3 rakennettiin siten, että se huomioi myös säilörehun SNAN:n metaboloitumisen (kuvio 10). Säilörehun SNAN metaboloitui mallin 2 mukaisesti bakteeritypeksi, alkueläintypeksi ja ammoniumtypeksi sillä erotuksella, että mallissa 3 ammoniumtyppi ei syntetisoitunut takaisin bakteeritypeksi.

Mallissa 3 liukenematon, potentiaalisesti hajoava fraktio (IDN = valkuaisfraktiot B_2 ja B_3) ja hajoamaton fraktio (UN = C-fraktio) virtasivat ulos pötsistä nopeudella $0,043 \text{ h}^{-1}$ (taulukko 14). Liukenemattoman valkuaisen ulosvirtaus oli nopeampaa kuin IDN :n synteesinopeus bakteeritypeksi ($0,032 \text{ h}^{-1}$) ja siksi huomattava osuus potentiaalisesti hajoavista fraktioista B_2 ja B_3 virtasi ulos pötsistä hajoamatta. Ammoniumtypen imeytyminen pötsin seinämän läpi oli huomattavasti nopeampaa, ($1,077 \text{ h}^{-1}$) kuin edellisissä malleissa. Liukoinen NAN metaboloitui hyvin nopeasti ($0,833 \text{ h}^{-1}$) bakteeritypeksi ja metaboloituminen oli huomattavasti nopeampaa kuin SNAN:n hajoaminen ammoniumtypeksi ($0,384 \text{ h}^{-1}$). Bakteerityppi virtasi ulos pötsistä nopeudella $0,040 \text{ h}^{-1}$, eli hitaammin kuin alkueläintyyppi ($0,085 \text{ h}^{-1}$). Alkueläimet söivät liukenematonta tyyppiä hyödyntäviä bakteereja suhteellisen nopeasti ($0,030 \text{ h}^{-1}$).



Kuvio 10. Malli 3. Säilörehun liukenemattoman typen metaboloituminen pötsissä.

UN = potentiaalisesti hajoamaton tyyppi, UN_outflow = potentiaalisesti hajoamattoman typen ulosvirtaus pötsistä, UN_escape = hajoamattoman typen ulosvirrannut määrä, IDN = liukenematon, potentiaalisesti hajoava tyyppi, kp_IDN_UN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen sekä potentiaalisesti hajoamattoman typen ulosvirtaus pötsistä (1/h), IDN_escape = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen ulosvirtaava määrä, ks_IDN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), Insoluble_N_to_bacteria_N = IDN:n muuttuminen bakteeritypeksi, Bacteria_N = bakteerityppi, Bacteria_N_outflow = bakteerityypin ulosvirtaus pötsistä, kp_bacteria_N = bakteerityypin ulosvirtausnopeus (1/h), Bacteria_N_escape = ulosvirtaavan bakteerityypin määrä, Bacteria_N_to_protozoa_N = bakteerityypin muuttuminen alkueläintypeksi, kd_bacteria_N = bakteerityypin synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), Protozoa_N = alkueläintyyppi, Protozoa_N_outflow = alkueläinten ulosvirtaus pötsistä, kp_protozoa_N = alkueläintypin ulosvirtausnopeus (1/h), Protozoa_N_escape = ulosvirtaavan alkueläintypin määrä, SNAN = liukoinen ei-ammoniumtyppi, SNAN outflow = SNAN:n ulosvirtaus, SNAN escape = ulosvirrannut SNAN:n määrä, SNAN_to_bacteria_N = SNAN:n syntetisoituminen bakteeritypeksi, ks_SNAN = SNAN:n synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_liquid = nesteen virtausnopeus (1/h), SNAN_to_ammonia_N = SNAN:n hajoaminen ammoniumtypeksi, kd_SNAN = SNAN:n hajoamisnopeus ammoniumtypeksi (1/h), Ammonia_N = ammoniumtyppi, Ammonia_N outflow = ammoniumtypen ulosvirtaus pötsistä, Ammonia_N escape = pötsistä ulosvirrannut ammoniumtypen määrä, Ammonia_N_absorption = ammoniumtypen imeytyminen, ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus (1/h), Absorbed_ammonia_N = pötsistä imeytynyt ammoniumtyppi.

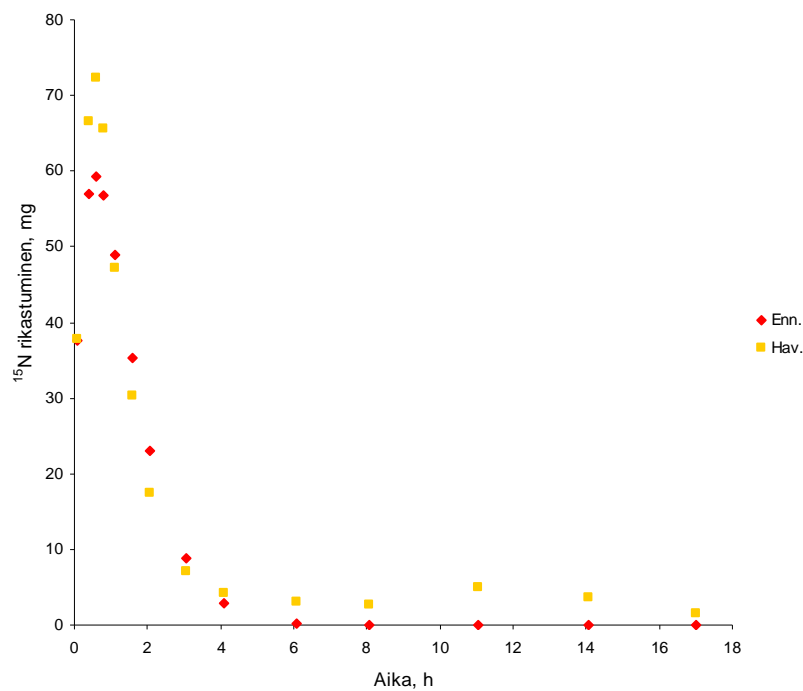
Taulukko 14. Säilörehun liukenemattoman typen metaboliareitit ja parametriarvot.

Parametri	Muoto	Arvo, 1/h	FSD
Malli 3			
kp_liquid	Kiinteä	0,224	ND
ka_ammonia_N	Muokattava	1,077	0,09
kp_bacteria_N	Muokattava	0,040	0,11
kd_bacteria_N	Muokattava	0,030	0,10
kp_protozoa_N	Muokattava	0,085	0,10
kd_SNAN	Muokattava	0,384	0,16
ks_SNAN	Muokattava	0,833	0,15
ks_IDN	Muokattava	0,032	0,17
kp_IDN_UN	Muokattava	0,043	0,04

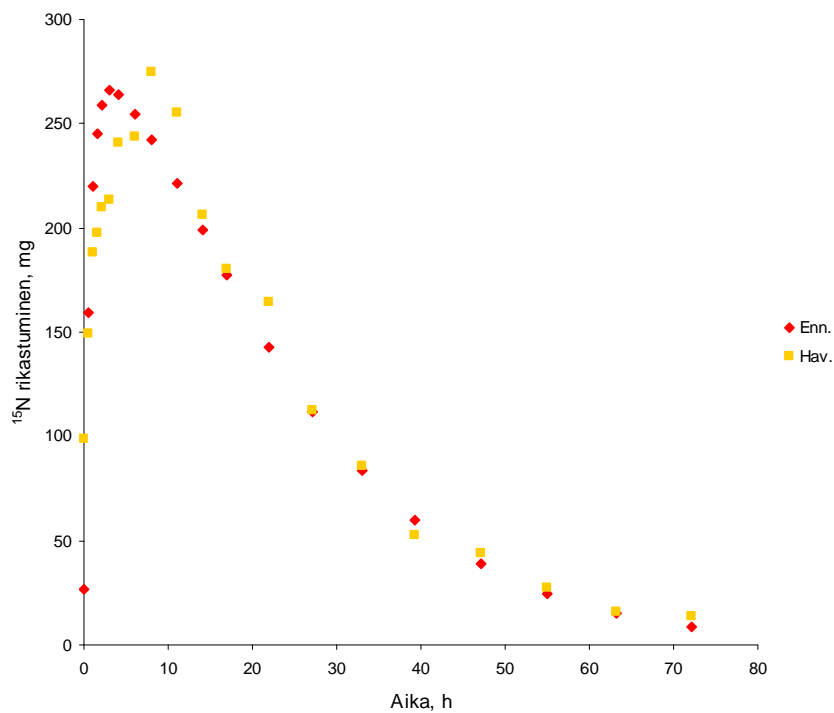
FSD = estimoidun parametriarvon suhteellinen keskihajonta, ND = ei määritetty, kp_liquid = nesteen virtausnopeus pötsistä satakertaan, ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus (1/h), kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteeritypen synteessinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_SNAN = liukoisen ei-ammoniumtypen hajotusnopeus ammoniumtypeksi, ks_SNAN = liukoisen ei-ammoniumtypen synteessinopeus bakteeritypeksi, ks_IDN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen synteessinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_IDN_UN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen sekä potentiaalisesti hajoamattoman typen ulosvirtaus pötsistä (1/h).

Mallin 3 typpifraktioiden metabolia vastasi tilannetta, jossa pötsiin oli annosteltu säilörehun liukenematonta fraktiota, joka jakaantui valkuaisen eri osafraktioihin taulukon 5 mukaisesti. Tällöin mallissa oli mukana myös liukoisia valkuaisfraktioita. Ammoniumtypen ¹⁵N-poolikoko (mg) saavutti huippunsa noin 40 min kuluttua liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 11). Todellisuudessa tämä kuvaa SNAN:n jäännösfraktion hajoamista ammoniumtypeksi, sillä liukenematon typi ei hajoa ammoniumtypeksi. Malli 3 aliarvioi ammoniumtypen ¹⁵N-poolikoon huippuarvon, mutta ennusti muuten melko hyvin ammoniumtypen metabolian ajanjaksolla 0-18 tuntia.

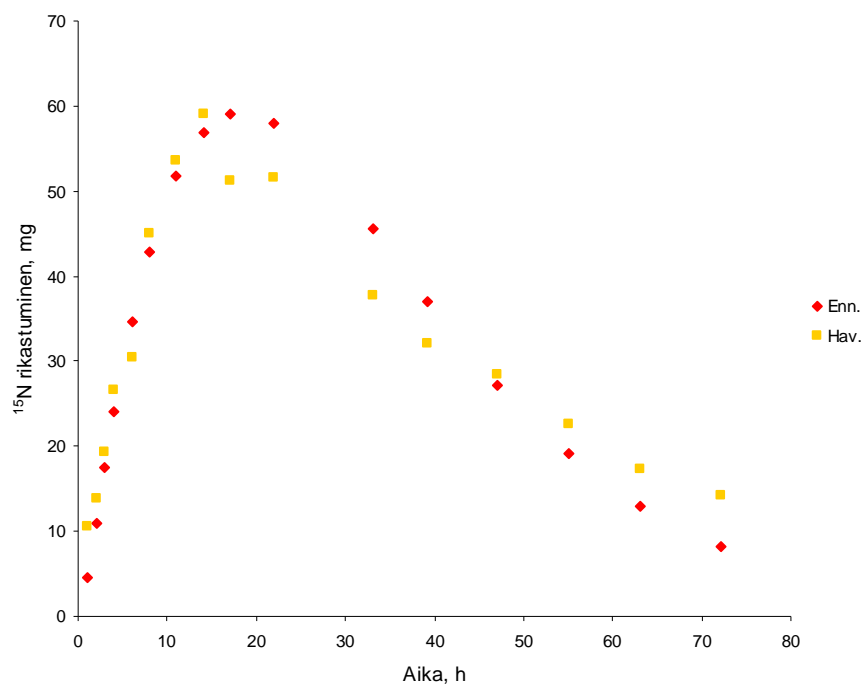
Edellisten mallien tavoin pötsin bakteerien ¹⁵N-poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa kolmen tunnin kohdalla liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 12). Bakteeritypen synteesi oli nopeaa, vaikka B₂ ja B₃ -fraktioiden synteesi mikrobivalkuaiseksi oli suhteellisen hidasta (0,032 h⁻¹). Tämä johtui siitä, että SNAN -jäännösfraktiossa oli runsaasti bakteereille käyttökelpoista typpeä. Malli 3 ennakoi bakteeritypen ¹⁵N-poolikoon huippuajankohdan, mutta ennusti hyvin ¹⁵N-poolikoon pienenemisen ajanjaksolla 15-80 tuntia. Alkueläinten ¹⁵N-poolikoko (mg) saavutti huippuarvonsa vasta 14 tunnin kuluttua liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 13). Alkueläinten metabolian mallintaminen onnistui hyvin ajanjaksolla 0-80 tuntia.



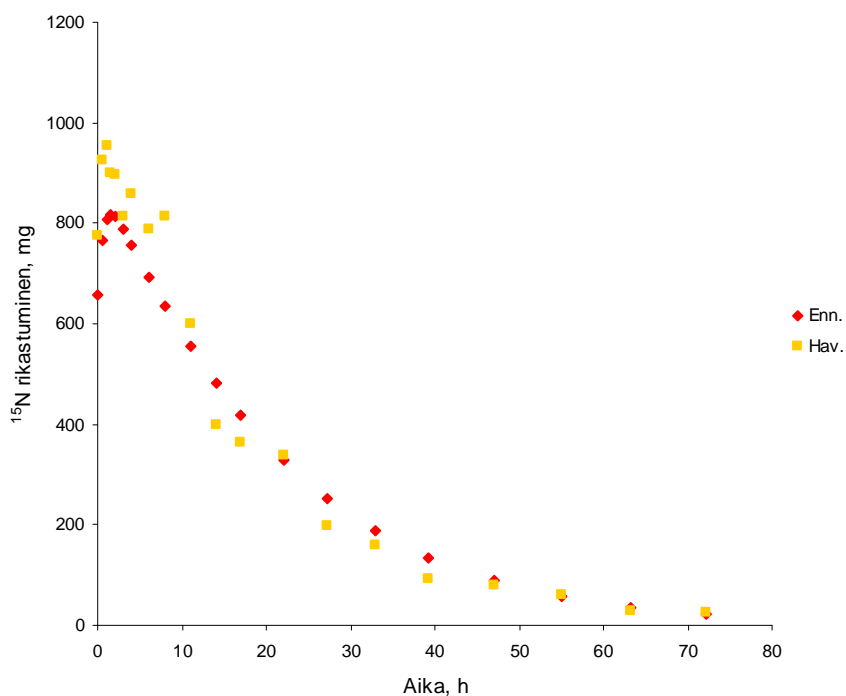
Kuvio 11. Ammoniumtypen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



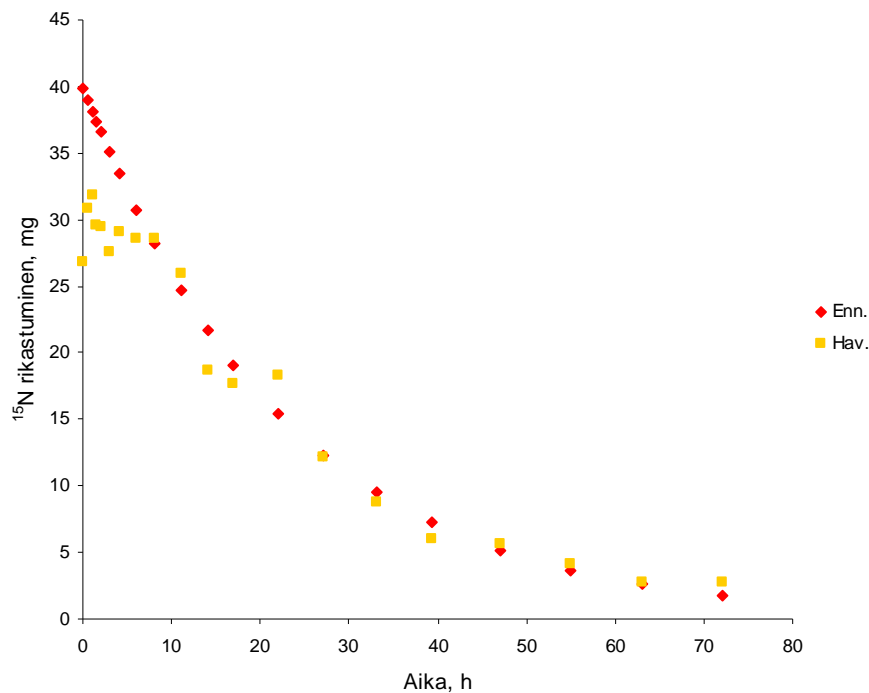
Kuvio 12. Pötsin bakteerien ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 13. Pötsin alkueläinten ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 14. Pötsin liukenemattoman typen ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.



Kuvio 15. Rehuvalkuaisen C-fraction ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ajan funktiona. Mallissa 3 ennustetut arvot sekä kokeessa havaitut arvot.

Mallin 3 ennusti pötsin liukenemattoman typen (bakteerityppi, alkueläintyyppi ja liukenematon rehutyyppi) ^{15}N -poolikoon (mg) saavuttavan huippunsa noin 1,5 tunnin kuluttua liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 14). Tämä johtui siitä, että ajanhetkellä nolla pötsissä oli runsaasti liukenematonta ^{15}N merkattua rehutyyppiä ja samaan aikaan syntetisoitui nopeasti bakteerityppiä, joka saavutti huippunsa jo kolmen tunnin kohdalla. Havaintoaineiston mukaan ^{15}N -poolikoon huippuarvo saavutettiin ajanhetkellä nolla. Rehuvalkuaisen C-fraction ennustettu ^{15}N -poolikoko saavutti huippuarvonsa ajanhetkellä nolla, koska C-fraction määrä oli suurimmillaan välittömästi liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 15). Valkuaisen C-fraction ^{15}N -poolikoko laski, koska ^{15}N merkattua C-fraktiota virtasi ulos pötsistä ja koska pötsiin ei tullut kerta-annoksen jälkeen ^{15}N merkattua C-fraktiota.

Mallissa 3 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot olivat suositusvälin (+0,8- -0,8) sisällä koko mallissa (taulukko 15). Alkueläinten metaboliaan liittyvien parametrien korrelaatiot olivat yhtä voimakkaita kuin edellisissäkin malleissa.

Taulukko 15. Mallissa 3 estimoitujen parametriarvojen väliset korrelaatiot.

Parametri	ka_ammonia_N	kp_bacteria_N	kd_bacteria_N	kp_protozoa_N
ka_ammonia_N	1.00	-0.31	0.34	0.26
kp_bacteria_N	-0.31	1.00	-0.79	-0.78
kd_bacteria_N	0.34	-0.79	1.00	0.76
kp_protozoa_N	0.26	-0.78	0.76	1.00
kd_SNAN	0.39	-0.07	0.04	0.02
ks_SNAN	-0.60	0.32	-0.38	-0.30
ks_IDN	0.33	0.27	-0.18	-0.01
kp_IDN_UN	-0.06	-0.30	0.02	-0.01
Parametri	kd_SNAN	ks_SNAN	ks_IDN	kp_IDN_UN
ka_ammonia_N	0.39	-0.60	0.33	-0.06
kp_bacteria_N	-0.07	0.32	0.27	-0.30
kd_bacteria_N	0.04	-0.38	-0.18	0.02
kp_protozoa_N	0.02	-0.30	-0.01	-0.01
kd_SNAN	1.00	0.32	0.13	-0.02
ks_SNAN	0.32	1.00	-0.31	0.06
ks_IDN	0.13	-0.31	1.00	-0.23
kp_IDN_UN	-0.02	0.06	-0.23	1.00

ka_ammonia_N = ammoniumtypen imeytymisnopeus (1/h), kp_bacteria_N = bakteeritypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_bacteria_N = bakteeritypen synteesinopeus alkueläintypeksi (1/h), kp_protozoa_N = alkueläintypen ulosvirtausnopeus (1/h), kd_SNAN = liukoisen ei-ammoniumtypen hajotusnopeus ammoniumtypeksi, ks_SNAN = liukoisen ei-ammoniumtypen synteesinopeus bakteeritypeksi, ks_IDN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen synteesinopeus bakteeritypeksi (1/h), kp_IDN_UN = liukenemattoman, potentiaalisesti hajoavan typen sekä potentiaalisesti hajoamattoman typen ulosvirtaus pötsistä (1/h).

Säilörehun liukenemattomasta tuestä 57 % ohitti pötsin hajoamatta, 24 % syntetisoitui bakteeritypeksi ja 18 % alkueläintypeksi (taulukko 16). Säilörehun SNAN:n jäännösfraktiosta 27 % hävisi pötsistä ammoniumtypen muodossa joko imeytymisen tai ulosvirtauksen kautta. Yhteensä 58 % SNAN-jäännösfraktiosta syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi, joka virtasi satakertaan bakteeri- ja alkueläintypen muodossa. Loppuosa (16 %) SNAN-jäännösfraktiosta ohitti pötsin hajoamatta.

Taulukko 16. Säilörehun liukenemattoman typen ja sen liukoisen ei-ammoniumtypen (SNAN) jäännösfraction simuloidut kulkeutumisreitit (%) pötsistä.

Kulkeutumisreitti	Säilörehun typpifraktioiden suhteellinen hävikki pötsistä, %	
	Säilörehun liukenematon typpi	Säilörehun SNAN-jäännös ¹
Imeytyminen ammoniumtyppinä	-	22
Bakteeritypen ulosvirtaus	24	33
Alkueläintypen ulosvirtaus	18	25
Ulosvirtaus nesteessä		
Ammoniumtyppinä	-	5
SNAN –fraktiona	-	16
Ulosvirtaus liukenemattomana typpinä	57	-

¹⁾ Liukoinen ei-ammoniumtyppi (SNAN), joka jäi säilörehun liukenemattomaan fraktioon pesun jälkeen.

4. Tulosten tarkastelu

4.1 Koerehujen laatu ja typen jakautuminen eri osafraktioihin

Kokeessa käytetyt timoteisäilörehu sekä ^{15}N -säilörehu olivat laadultaan hyviä. Molemmissa säilörehuissa oli riittävästi NDF-kuitua ($> 500 \text{ g/kg ka}$). Myös säilönnällinen laatu oli moitteetonta lukuunottamatta timoteisäilörehun korkeaa ammoniumtypen osuutta (80 g/kg ka), joka ylittää suositusrajan 70 g/kg ka (Artturi 2007). Timoteisäilörehussa tapahtui lievää virhekäymistä varastoinnin aikana, jonka lopputuloksena tyypellisiä yhdisteitä hajosi ammoniumtypeksi.

Nurmisäilörehun valkuaisen jakaantuminen eri osafraktioihin (A, B₁, B₂, B₃ ja C) oli yhteneväinen aikaisempien tutkimusten kanssa (Ahvenjärvi ym. 1999; Choi ym. 2002). Liukoisen ja liukenemattoman typen fraktioissa ^{15}N osuus kokonaistypestä vaihteli 5,56-3,55 % välillä, vaikka säilörehu lannoitettiin lannoitteella, jossa 10 % kokonaistypestä oli ^{15}N muodossa. Erot typpifraktioiden ^{15}N %-osuuksissa johtuivat siitä, että kasvi otti myös maaperän mineralisoitunutta rikastumatonta typpeä. Typpifraktioiden ^{15}N osuus (%) kokonaistypestä oli fraktiossa C huomattavasti muita fraktioita pienempi, koska C-fraktion osuus kasvaa kasvin vanhetessa ja oli vielä suhteellisen pieni sadonkorjuuhetkellä. Koska typen kulkeutuminen lannoitteesta ja maasta kasviin on monimutkainen prosessi ja koska ^{15}N pitoisuus vaihteli eri valkuaisfraktioiden välillä, oli välttämätöntä, että ^{15}N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) ennen pötsiin annostelua laskettiin kullekin valkuaisfraktiolle erikseen.

4.2 Ravintoaineiden syönti, dieetin sulavuus ja maidontuotanto

Tässä tutkimuksessa lehmät olivat laktaatiokauden alkuvaiheessa ja söivät tuotettuun maitomäärään nähden normaalin määrän rehun kuiva-ainetta (23 kg KA^{-1}). Ravintoaineiden sulavuusarvot olivat yhteneviä edellisten tutkimusten kanssa (Ahvenjärvi ym. 1999; Ahvenjärvi ym. 2002), mutta rehun syöntimäärät olivat edellisiä tutkimuksia suuremmat. Koko dieetin NDF-kuidun pitoisuus oli $41,8 \text{ \% KA}^{-1}$ ja dieetin raakavalkuaispitoisuus $15,5 \text{ \% KA}^{-1}$. Ahvenjärvi ym. (1999) havaitsivat, että nurmisäilöhupohjaisella dieetillä pötsimikrobien ammoniumtypen, aminohappojen ja peptidien tarve voidaan täyttää hyvin pienellä dieetin raakavalkuaisosalla ($12,7 \text{ \%}$), eikä lisävalkuaisen syöttäminen lisännyt

satakertaan virtaavan mikrobeista peräisin olevan NAN:n määrää. Koska myös NDF-kuitua oli dieetissä runsaasti ja NDF:n sulavuus oli korkea (0,643), voidaan olettaa että pötsin olosuhteet vastasivat tyypillisen nurmisäilörehupohjaisen dieetin olosuhteita, jossa oli riittävästi ravintoaineita myös sellulolyttisille bakteereille. Faichney ym. (1997) havaitsivat, että lampaan pötsissä bakteeritypen osuus pelkällä heinäruokinnalla oli 58-62 % mikrobimassasta, mutta väkirehun lisääminen (33 %) dieettiin laski bakteeritypen osuuden 33-40 % tasolle. Aikaisempien tutkimusten perusteella (Jouany 1996) alkueläimet käyttävät hyväkseen liukenematonta tyypeä, jota myös on enemmän väkirehuissa kuin nurmisäilörehussa. Tässä kokeessa käytetty dieetti sisälsi väkirehua noin 38 %. Korkeatuottoisen lehmän dieetti sisältää tyypillisesti enemmän väkirehua kuin tässä kokeessa käytetty dieetti, jolloin myös alkueläinten määrä pötsissä saattaa olla suurempi. Tässä tutkimuksessa ei arvioitu sitä, millaisia vaikutuksia eri mikrobipopulaatioilla on dynaamisen mallintamisen tuloksiin. On kuitenkin selvää, että dieetin koostumus vaikuttaa pötsin mikrobistoon, koska mikrobeilla on erilainen metabolia. Jatkotutkimusten perusteella voidaan arvioida, pätevätkö tässä kokeessa saadut tulokset yleisesti. Tässä kokeessa päivässä tuotettu 33,3 kg lehmäkohtainen maitomäärä oli suhteellisen pieni, koska lehmät olivat juuri ohittaneet laktaatiokauden huippuvaiheen. Suomalaisissa karjoissa, joissa koko laktaatiokauden päivittäinen lehmäkohtainen maitomäärä ylittää 30 kg keskiarvon rajan, tuotetaan vuodessa yli 9000 kg maitoa/lehmä.

4.3 Dynaamisen mallin käyttökelpoisuus

Dynaamisten mallien perustana on aikaisempien tutkimuksien luoma teoreettinen käsitys tyypellisten yhdisteiden aineenvaihdunnasta pötsissä. Rakennetut mallit ovat hypoteeseja, joiden oikeellisuutta arvioidaan sovittamalla mallia kokeelliseen havaintoaineistoon. Dynaamisten mallien rakentamisessa on tärkeintä, että mallit kuvaavat mahdollisimman luotettavasti elimistössä tapahtuvaa aineenvaihduntaa. Mallien monimutkaisuus riippuu havaintoaineiston sisältämästä informaatiosta, sillä mallit eivät luo mitään uutta informaatiota. Mallien avulla voidaan tutkia, selittääkö teoria kokeellisesti havaittuja ilmiöitä. Jos rakennettu malli on liian yksinkertainen, se ei kykene riittävän tarkasti jäljittelemään ja ennustamaan systeemin toimintaa. Tällöin mallilla ei ole riittäviä mahdollisuuksia asettaa estimoituja arvoja havaittuja arvoja vastaaviksi. Toisaalta, jos malli on liian monimutkainen suhteessa havaintoaineiston sisältämään informaatioon, estimoituja parametriarvoja ei saada riittävän

luotettaviksi. Tällöin havaittujen arvojen avulla ei voida selittää koko mallin rakennetta, eikä parametriarvojen muuttaminen paranna tilannetta (Wastney ym. 1993). Tosiasiassa liian monimutkainenkin malli on yksinkertaisempi kuin todellisuus. Tarkastelimme malleissa pötsin kuutta eri tyypipoolia sen vuoksi, että käsityksemme mukaan ne ovat pötsin typpiaineenvaihdunnan kannalta keskeisiä tekijöitä. Mallinnus on iteratiivinen prosessi, jossa kokeilemalla etsitään parhaiten havaintoaineistoa kuvaava malli. Mallin käyttökelpoisuutta arvioitaessa tärkeintä on pystyä vertailemaan luotettavasti kokeissa havaittuja arvoja malleissa ennustettuihin arvoihin. Lopullisessa mallissa havaittuja ja ennustettuja arvoja tulee arvoida yhtäaikaan graafisesti, matemaattisesti ja tilastollisesti, sillä kukin arviointitapa tuottaa tietoa mallin toiminnasta eri tavoilla.

Graafinen tarkastelu on käyttökelpoinen tapa arvoida mallin toimintaa, sillä mallin luotettavuus riippuu hyvin pienistä eroista havaittujen ja ennustettujen arvojen välillä. Havaittujen ja ennustettujen arvojen erotuksena saadaan jäännösarvot eli residuaalit, joiden yhteenlaskettu neliösumma on tärkeä parametri mallin luotettavuutta arvioitaessa. Arvojen suhde ja residuaali voidaan laskea joko summana tai erikseen jokaiselle muuttujalle. Residuaalien neliöiden summa kuvaa virhetermin suuruutta mallin sekä kaikkien havaittujen arvojen välillä. Mallin tarkentamisen vuoksi on olennaista erotella kunkin parametriarvoestimaatin virhetermin suuruus erikseen, jotta tiedetään mikä kohta mallista on luotettavin ja mikä epäluotettavin. Suhteellinen keskihajonta (FSD) on työkalu, jonka avulla myös tässä tutkimuksessa arvoitiin mallien 1, 2 ja 3 käyttökelpoisuutta. Suhteellinen keskihajonta saadaan jakamalla kunkin fraktion hajonta (SD) sen keskiarvolla. Yleisesti hyväksyttävinä ohjearvoina pidetään $FSD < 0,50$. Ennustettujen parametriarvojen keskinäiset korrelaatiot tulisi olla välillä $+0,8$ - $-0,8$ (Wastney ym. 1993). Aliparametrisoidussa mallissa fraktioiden suhteelliset hajonnat nousevat helposti liian suuriksi, sillä malli ei pysty estimoimaan havaittuja arvoja riittävän tarkasti. Vastaavasti yliparametrisoidussa mallissa parametrien väliset korrelaatiot nousevat liian suuriksi. Voimakkaasti korreloituva parametri ei ole mallin toiminnan kannalta hyödyllinen ja siksi parametrin poistaminen ei paranna tai huononna jäljelle jäävän mallin toimintaa.

4.3.1 Virtauskinetiikka

Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, että rehun syönti vaikuttaa suoraan pötsin nesteen ja partikkelien virtauskinetiikkaan ja että nesteen ulosvirtaus on partikkelien

ulosvirtausta nopeampaa (Huhtanen ja Jaakkola 1992; Jaakkola ja Huhtanen 1992). Vertailtaessa eri tutkimuksia keskenään on kuiva-aineen syönnin lisäksi otettava huomioon käytetyn merkkiaineen vaikutukset tuloksiin. Edellisten tutkimusten perusteella (Huhtanen ja Hristov 2001; Ahvenjärvi ym. 2004) ^{15}N -isotoopilla merkattu rehun ADF-N-fraktio (ADF- ^{15}N) ennustaa luotettavasti partikkelien virtausta pötsistä, koska ADF-N-fraktio on käytännöllisesti katsoen pötsissä sulamaton. Tässä tutkimuksessa partikkelien virtauskinetiikkaa ei laskettu merkkiaineen avulla, koska ei ollut perusteltua olettaa, että partikkeleihin kiinnittyneiden bakteerien ja alkueläinten virtausnopeus pötsistä on sama kuin pötsiin annosteltujen karkearehupartikkelien virtausnopeus. Tämä johtuu siitä, että partikkeleihin kiinnittyneitä bakteereja ja alkueläimiä on myös väkirehupartikkeleissa, joiden virtausnopeus on suurempi kuin karkearehupartikkelien. Lisäksi pötsissä on eri ikäisiä ja eri asteisesti sulatettuja partikkeleita, joiden virtausnopeudet poikkeavat merkattujen karkearehupartikkelien virtausnopeudesta.

WinSAAM estimoi bakteereille, alkueläintypelle ja liukenemattomalle typelle parhaiten havaintoaineistoon sopivat parametriarvot. Malleissa 1, 2 ja 3 bakteeritypen virtausnopeudet olivat 0,051, 0,057 ja 0,040 h^{-1} . Mallien välillä yksittäisten parametriarvojen vertailu ei välttämättä ole yksiselitteistä, koska parametriarvot mallin sisällä korreloivat aina keskenään. Bakteeritypen virtausnopeus pötsistä näyttäisi silti olleen nopeampaa liukoisten typpifraktioiden malleissa (mallit 1 ja 2) kuin liukenemattoman typen mallissa. Tämä saattoi johtua siitä, että pötsin bakteerit käyttävät joko liukoista tai liukenematonta tyypeä mikrobivalkuaisen synteisiin (Russell ym. 1992), jolloin näillä bakteereilla saattaa olla eri virtausnopeudet. Lisäksi ammoniumtyppi siirtyy ennemmin nesteeseen kuin partikkeleihin kiinnittyneisiin bakteereihin (Hristov ja Broderick 1996; Faichney ym. 1997) ja ammoniumtypestä muodostuneen mikrobivalkuaisen osuus mallissa 3 oli malleja 1 ja 2 pienempi. Voidaan olettaa, että malleissa 1 ja 2 nesteen mukana ulosvirtaavien bakteerien osuus bakteerien kokonaismäärästä oli suurempi kuin mallissa 3 ja siksi koko bakteeripoolin virtausnopeuskin oli suurempi näissä malleissa. Alkueläintypen virtausnopeudet olivat vastaavasti 0,031, 0,027 ja 0,085. Alkueläintypen suuremmalle virtausnopeudelle mallissa 3 ei löydy yksiselitteistä vastausta, sillä virtausnopeuden olettiin olevan riippumaton ulosvirtaavan fraktion poolikoosta. Liukoista typpifraktioista muodostunut alkueläinpooli saattaa käyttäytyä pötsissä eri tavalla kuin liukenemattomista fraktioista peräisin oleva. Faichney ym. (1997) arvioivat bakteeri- ja alkueläintypen virtausnopeudeksi 0,049 ja 0,031 h^{-1} , kun lampaille syötettiin koiranheinää ainoana rehuna.

Ottamalla huomioon ulosvirtaavien fraktioiden (bakteerityppi, alkueläintyyppi ja liukenematon rehutyyppi) suhteelliset osuudet malleissa 1, 2 ja 3, pötsin partikkelien virtausnopeudet olivat vastaavasti 0,047, 0,053 ja 0,049 h⁻¹. Huhtanen ja Hristov (2001) arvioivat pötsin partikkelien virtausnopeudeksi 0,039 h⁻¹, kun merkkiaineena käytettiin ADF-¹⁵N:sta. Faichney ym. (1997) arvioivat partikkelien keskimääräiseksi virtausnopeudeksi 0,050 h⁻¹, kun merkkiaineena käytettiin ytterbium asetaattia. Ahvenjärvi ym. (2004) havaitsivat, että ytterbium yliarvioi pötsin partikkelien virtausnopeuden.

Mallissa 3 sekä IDN- että UN-fraktiot virtasivat ulos pötsistä nopeudella 0,043 h⁻¹. Potentiaalisesti hajoavan ja hajoamattoman fraktion ulosvirtausnopeudet eivät välttämättä ole yhtäsuuret, kuten useissa aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu. Hristov ym. (2001) arvioivat mikrobeille käytettävissä olevan, kuituun sitoutuneen typen ulosvirtausnopeudeksi 0,037 h⁻¹ ja happodetergenttiin liukenemattoman typpifraktion (ADIN) virtausnopeudeksi 0,060 h⁻¹. Koska partikkelien koko ja ominaispaino vaikuttavat oleellisesti partikkelien virtausnopeuteen (Tamminga ym. 1989), voisi olettaa, että osittain fermentoituvien partikkelien virtausnopeus on hitaampi kuin fermentoitumattomien. Tähän vaikuttaa myös se, kuinka tasaisesti potentiaalisesti fermentoituva ja fermentoitumaton aines on sekoittunut ruokasulan rehupartikkeleissa. Saattaa silti olla, että rehuvalkuaisen C-fraktion virtausnopeus on aliarvioitu mallissa 3. Mallin toimivuuden kannalta tällä ei ole merkitystä, sillä C-fraktion oletetaan olevan pötsissä sulamatonta.

Nestevirtauksen estimointi pötsistä on huomattavasti yksinkertaisempaa kuin partikkelien virtauksen estimointi. Teeter ja Owens (1983) havaitsivat, että liukoinen merkkiaine sekoittui ja tasoittui nopeasti pötsin vapaan nestepoolin ja partikkeleihin kiinnittyneen nestepoolin välillä ja että yksi nestepooli riittää selittämään pötsissä tapahtuvaa nesteen virtausta. Tässä kokeessa nesteen virtausnopeudeksi estimoitiin 0,224 h⁻¹, jota käytettiin virtausvakiona kaikissa malleissa. Seo ym. (2007) estimoivat nesteen virtausnopeutta lypsylehmien pötsissä dynaamisen mallin avulla, joka perustui neljään eri nestepooliin. Heidän rakentamansa malli estimoi nesteen virtausnopeudeksi 0,129 h⁻¹ vaihteluvälillä 0,064-0,206 h⁻¹. Eläimet söivät kuiva-ainetta keskimäärin 18,2 kg päivässä välillä 11,0-25,5 kg ka. Nesteen virtausnopeus (h⁻¹) lisääntyi lineaarisesti suhteessa nesteen virtaukseen (kg/h), mutta vähentyi suhteessa nesteen määrään (kg) pötsissä. Virtaus ei kuitenkaan ole lineaarisesti muuttuva tekijä, sillä siihen vaikuttavat useat eläimen syöntiä ja käyttäytymistä säätelevät tekijät (Seo ym. 2007). Volden ym. (2002) mallinsivat säilörehun liukoisten typpifraktioiden virtauskinetiikkaa ja

arvioivat nesteen virtausnopeudeksi $0,166 \text{ h}^{-1}$, joka oli hyvin lähellä Hristovin ja Broderickin (1996) Cr-EDTA:lla estimoitua arvoa $0,160 \text{ h}^{-1}$.

Mallien 1, 2 ja 3 partikkelien virtausnopeudet olivat yhteneväisiä edellisten tutkimusten kanssa, mutta nesteen virtausnopeus $0,224 \text{ h}^{-1}$ oli edellisiä tutkimuksia (Huhtanen ja Jaakkola 1992; Jaakkola ja Huhtanen 1992; Hristov ja Broderick 1996; Volden ym. 2002; Seo ym. 2007) suurempi. Toisaalta myös kuiva-aineen syöntimäärä oli tässä tutkimuksessa suuri. Rehun syöntimäärä vaikuttaa sekä nesteen että partikkelien virtauskinetiikkaan ja sitä kautta myös pötsin ohittavan hajoamattoman valkuaisen ja mikrobivalkuaisen suhteellisiin osuuksiin. Useiden tutkimusten (Robinson ym. 1985; Clark ym. 1992; Volden 1999; Bach ym. 2005) perusteella fermentoituvan orgaanisen aineen määrä pötsissä korreloi positiivisesti mikrobivalkuaisen synteesin tehokkuuden kanssa. Volden (1999) havaitsi, että bakteeritypen synteesi korreloi voimakkaasti myös nesteen ja partikkelien virtausnopeuksien kanssa. Firkins ym. (1987) päätyivät vastaaviin johtopäätöksiin. He havaitsivat myös, että alkueläinten määrä suhteessa bakteereihin pieneni, kun virtausnopeus kasvoi. Kasvava nesteen ja partikkelien virtausnopeus vähensi energian uudelleen kiertoa pötsissä, koska soluhajoaminen vähentyi. Edellisissä tutkimuksissa (Volden 1999; Bach ym. 2005) on arveltu, että tämä vähentää mikrobien ylläpitoenergian tarvetta ja lisää mikrobien kasvuun saatavilla olevan energian määrää.

4.3.2 Ammoniumtypen metabolia

Ammoniumtypen metabolia pötsissä oli erittäin nopeaa, sillä mallin 1 mukaan ammoniumtyppeä hävisi pötsistä yhteensä kolmen eri metaboliareitin kautta nopeudella $1,217 \text{ h}^{-1}$. Kaikki pötsiin annosteltu ammoniumtyyppi ei kuitenkaan hävinnyt pötsistä alle tunnissa, sillä mallien parametriarvot kuvaavat poolin keskimääräistä viipymisaikaa. Kuvion 3 perusteella voidaan todeta, että todellisuudessa lähes kaikki ammoniumtyyppi hävisi pötsistä noin neljän tunnin kuluttua ammoniumtypen pötsiin annostelun jälkeen. Tulokset ovat yhteneväisiä Hristovin ym. (2005) tulosten kanssa. Ammoniumtypen absoluuttinen viipymäaika pötsissä oli keskimääräistä arvoa suurempi, koska virtaus perustui asympotoottisesti nollaa lähestyvään differentiaaliyhtälöön. Kun aineiden virtausta tapahtui fraktiosta A fraktioon B, fraktion A poolikoko pieneni. Estimoidut parametriarvot kuvasivat kunkin poolin metaboliareittien suhteellisia osuuksia. Suhteellinen osuus (%) saatiin, kun

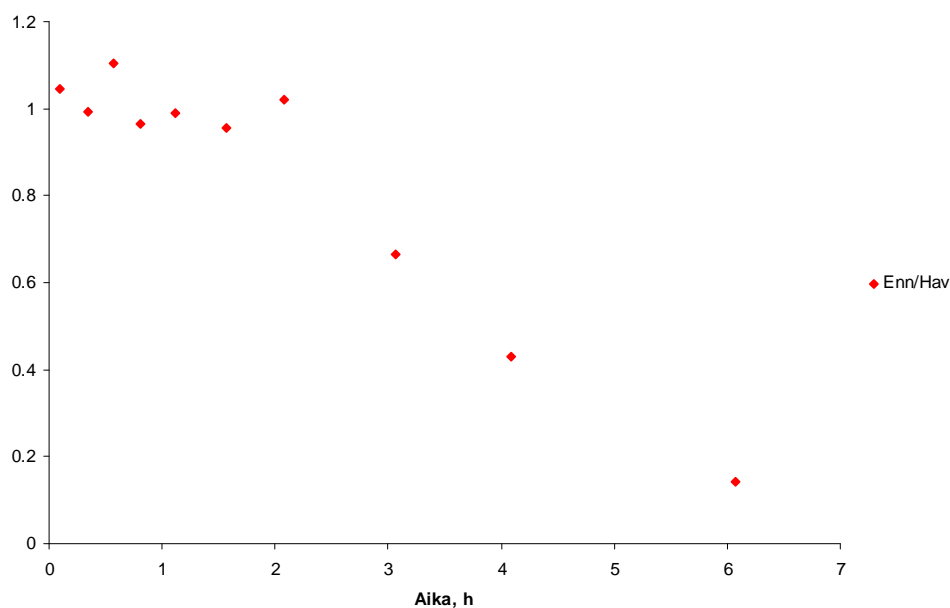
jaettiin kunkin metaboliareitin nopeus samaan pooliin vaikuttavien rinnakkaisten reittien yhteisnopeudella.

Malli 1 estimoi ammoniumtypen imeytymisen, ulosvirtauksen ja synteesin bakteeritypeksi erinomaisesti, sillä parametrien suhteelliset keskihajonnat olivat pieniä ($<0,10$). Mallissa 1 ennustettujen ja kokeessa havaittujen arvojen suhde pötsin ammoniumtypen poolissa oli noin yksi ja pysyi melko vakiona noin kahden tunnin ajan ammoniumtypen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 16). Tämän jälkeen ennustetut arvot pienenivät lineaarisesti suhteessa havaittuihin arvoihin. Tämä ei kuitenkaan heikentänyt merkittävästi mallin 1 luotettavuutta, sillä lähes kaikki merkattu ammoniumtppi oli hävinnyt pötsistä neljän tunnin kuluttua ammoniumtypen annostelun jälkeen. Koska ammoniumtypen ^{15}N -poolikoko laski hyvin nopeasti ja koska merkattun ammoniumtypen määrä pötsissä oli hyvin pieni jo kahden tunnin jälkeen, pienetkin erot havaittujen ja ennustettujen arvojen välillä olivat suhteellisesti suuria.

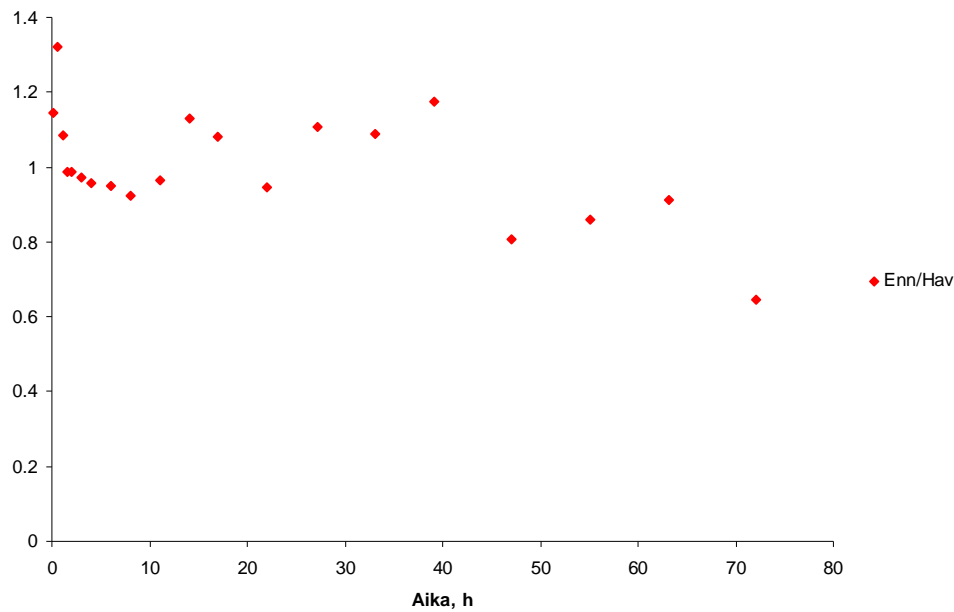
Pötsin bakteerit ottivat ammoniumtyppeä hitaammin kuin malli 1 ennusti, sillä tunnin kuluttua ammoniumtypen annostelun jälkeen pötsin bakteerien ^{15}N ennustettu arvo oli 30 % suurempi kuin havaittu. Tästä huolimatta ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde pötsin bakteereissa pysyi melko vakaana 40 tunnin ajan ammoniumtypen pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 17). Tämän jälkeen ennustetut arvot pienenivät suhteessa havaittuihin arvoihin, mutta vielä 63 tunnin kohdalla ennustetun ja havaitun arvon suhde oli 0,91. Merkattun bakteeritypen määrä pötsissä oli hyvin pieni 50 tunnin jälkeen annostelusta. Havaintoaineiston mukaan alkueläinten ^{15}N -poolikoko saavutti huippuarvonsa nopeammin kuin malli 1 estimoi (kuvio 18). Vaikka alkueläinten ^{15}N -poolikoon muutoksia kuvaavalle käyrälle asetettiin alkuarvo, ei estimoitua käyrää saatu silti kulkemaan täysin havaittujen arvojen mukaisesti. Tätä lukuunottamatta estimoidut arvot kuvasivat melko luotettavasti alkueläinten metaboliaa, sillä ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde pötsin alkueläimissä vaihteli välillä 0,85-1,16 aikavälillä 0-72 tuntia ammoniumtypen pötsiin annostelun jälkeen.

Alkueläintypen metabolian parametriarvoissa oli enemmän hajontaa kuin ammoniumtypen tai bakteeritypen metabolian parametriarvoissa, mikä näkyi suurempina FSD-arvoina näissä parametriarvoissa. Parametrien suhteelliset keskihajonnat olivat silti suositusrajan (0,50) alapuolella koko mallissa. Alkueläinten metaboliaan liittyvien parametriarvojen korrelaatiot olivat voimakkaampia kuin mallissa keskimäärin. Alkueläintypen ulosvirtauksen ja alkueläinten bakteeritypen syöntinopeuden välinen korrelaatio (0,91) oli suuri, koska

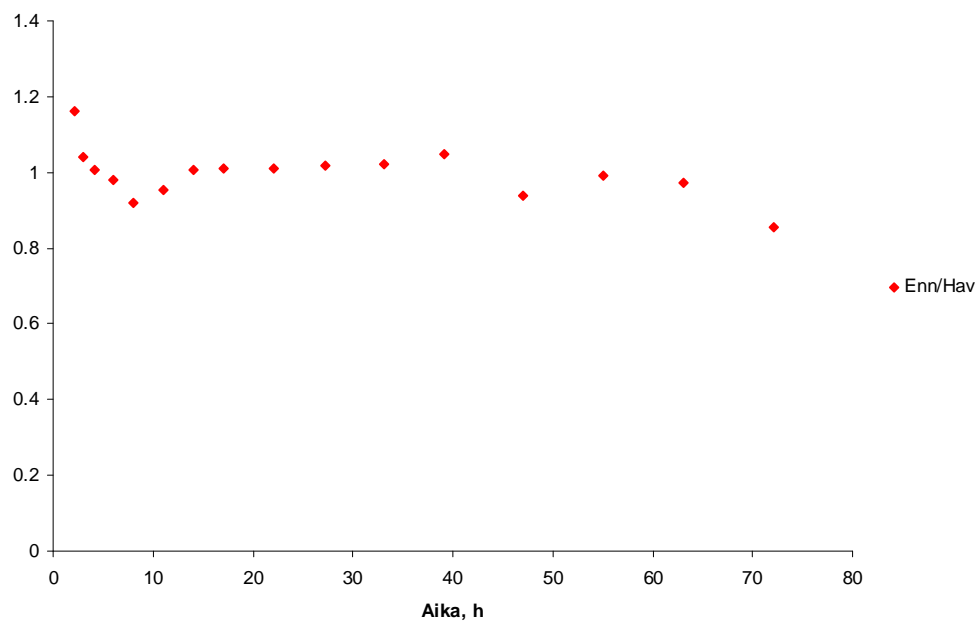
simulointi minimoi koko mallin residuaaleja. Nämä parametriarvot korreloivat väistämättä, koska ne olivat ainoat alkueläintypen poolikokoon vaikuttavat virtausreitit. Yhtäläillä myös bakteeritypen ulosvirtausnopeus ja alkueläinten bakteeritypen syöntinopeus korreloivat keskenään. Tällaisessa tapauksessa ei ole kysymys mallin yliparametrisoinnista. Alkueläinten metaboliaan liittyvät suuret FSD-arvot kertovat mallin 1 epäluotettavuudesta alkueläinten metaboliaa ennustettaessa. Todennäköisesti rakennettu malli oli liian yksinkertainen eikä onnistunut täysin selittämään ammoniumtypestä syntetisoituneen alkueläinten monimutkaista metaboliaa.



Kuvio 16. Ammoniumtypen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.



Kuvio 17. Pötsin bakteerien ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.



Kuvio 18. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 1.

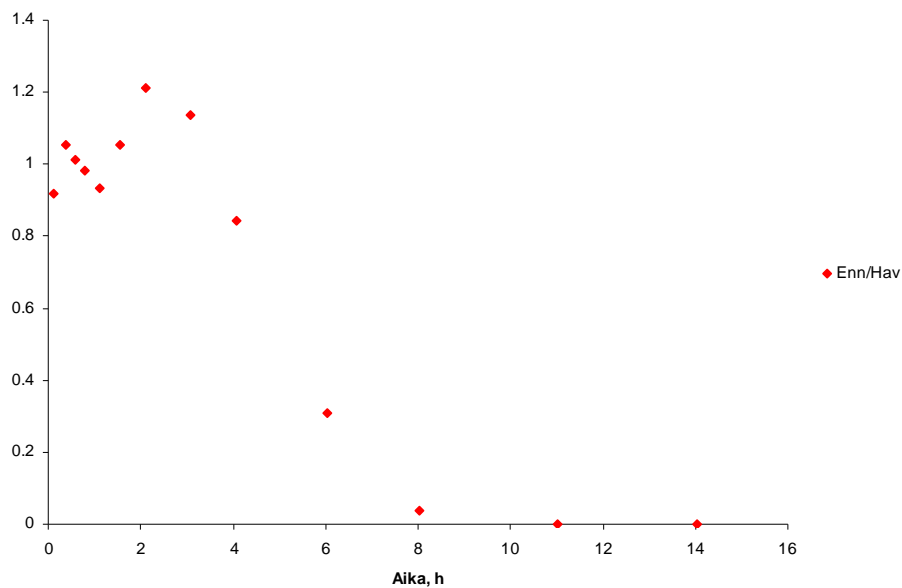
Tässä mallissa 44 % ammoniumtypestä virtasi pötsistä ulos mikrobivalkuaisen muodossa eli alle puolet ammoniumtypestä pystyttiin hyödyntämään pötsissä. Tämä oli kuitenkin enemmän kuin edellisten tutkimusten perusteella on arvioitu. Hristov ym. (2005) totesivat, että 23-33 % pötsiin annostellusta ammoniumtypestä virtasi pötsistä ulos mikrobivalkuaisen muodossa ja

vastaavasti 67-77 % imeytyi pötsin seinämän läpi ja virtasi ulos pötsistä nestefaasin mukana. Faichney ym. (1997) arvioivat, että 73-76 % dieetin kokonaistypestä muuttui ammoniumtypeksi ja hävisi pötsistä imeytymisen, ulosvirtauksen tai mikrobivalkuaisen muodossa. Ammoniumtypen hyväksikäyttö pötsissä on kuitenkin suuresti riippuvainen dieetin raakavalkuaispitoisuudesta (Hristov ym. 2005) ja siksi ei voida suoraan päätellä, onko ammoniumtypen hyväksikäyttö aliarvioitu aikaisemmissa tutkimuksissa. Faichney ym. (1997) arvioivat, että 56 % bakteeritypestä ja 23 % alkueläintypestä oli peräisin ammoniumtypestä. Hristov ja Broderick (1996) arvioivat vastaaviksi osuuksiksi 57 ja 32 %, kun dieetti perustui yksinomaiseen sinimailas säilörehuun. Alkueläimet eivät kuitenkaan ota ammoniumtyppeä suoraan, vaan syömänsä bakteerimassan kautta (Hristov ym. 2001; Choi ym. 2002). Lisäksi on arveltu, että ammoniumtyyppi siirtyy ennemmin nestefaasiin kiinnittyneisiin kuin partikkelifaasiin kiinnittyneisiin bakteereihin (Hristov ja Broderick 1996; Faichney ym. 1997). Maitovalkuisen tyypestä 17-28 % on arvioitu olevan peräisin ammoniumtypestä (Hristov ym. 2005). Tämän tutkimuksen perusteella suurempi osuus maidon valkuaistypestä saattaisi olla peräisin ammoniumtypestä, koska ammoniumtypestä peräisin olevan mikrobivalkuisen osuus oli suurempi kuin Hristov ym. (2005) arvioivat.

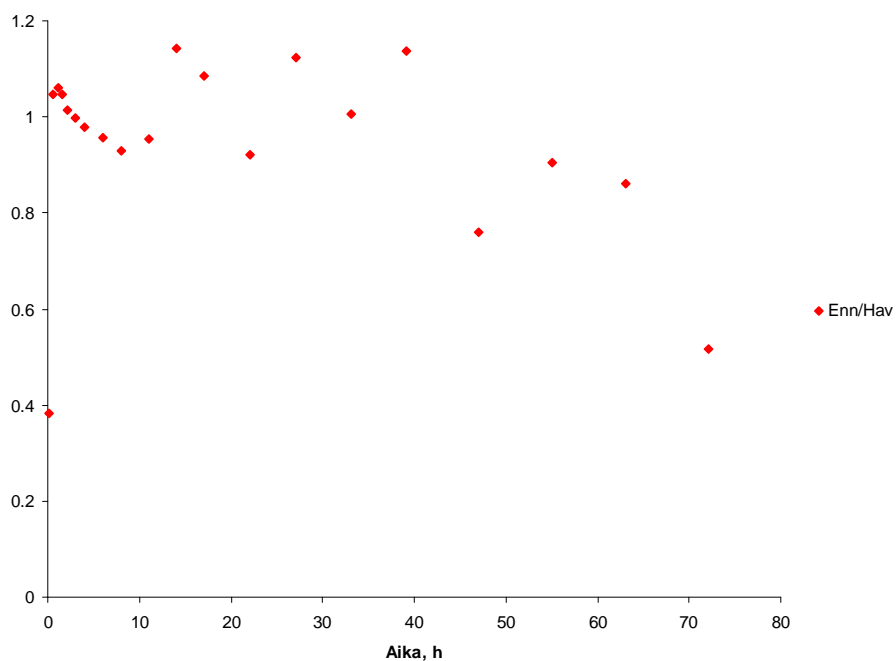
4.3.3 Säilörehun liukoisen ei-ammoniumtypen metabolia

Liukoinen ei-ammoniumtyyppi, joka sisältää pääosin peptidejä ja aminohappoja, oli suurin säilörehun typpifraktioista (taulukko 5). Choin ym. (2002) mukaan 62 % pötsin ohittavasta SNAN:stä oli peptidejä, 25,5 % valkuaistypeä ja 12,5 % aminotypeä. Mallissa 2 SNAN hajosi ammoniumtypeksi, syntetisoitui bakteeritypeksi ja virtasi ulos pötsistä yhteisnopeudella $1,696 \text{ h}^{-1}$, eli teoreettisesti nopeammin kuin ammoniumtyyppi mallissa 1. Vaikka osa SNAN-fraktiosta hajosi ammoniumtypeksi erittäin nopeasti ($0,907 \text{ h}^{-1}$), silti huomattava osa (38 %) pötsissä metaboituvasta SNAN:stä syntetisoitui suoraan bakteeritypeksi ja vastaavasti 62 % hajosi ammoniumtypeksi. Tämä johtuu siitä, että osa pötsin bakteereista käyttää peptidejä ja aminohappoja typen lähteenään (Russell ym. 1992). Malli 2 estimoi SNAN:n metaboitumisen ammonium- ja bakteeritypeksi erinomaisesti FSD-arvoilla 0,07 ja 0,10. Pötsin ammoniumtypen ^{15}N havaittujen ja ennustettujen arvojen suhde pysyi melko vakaana (0,84-1,21) aikavälillä 0-4 tuntia, jonka jälkeen ennustetut arvot pienenivät suhteessa havaittuihin arvoihin (kuvio 19). Kuten mallissa 1, myös malli 2 estimoi silti melko hyvin ammoniumtypen metabolian ($\text{FSD}_{\text{ka_ammonia_N}} = 0,08$ ja $\text{FSD}_{\text{ks_ammonia_N}} =$

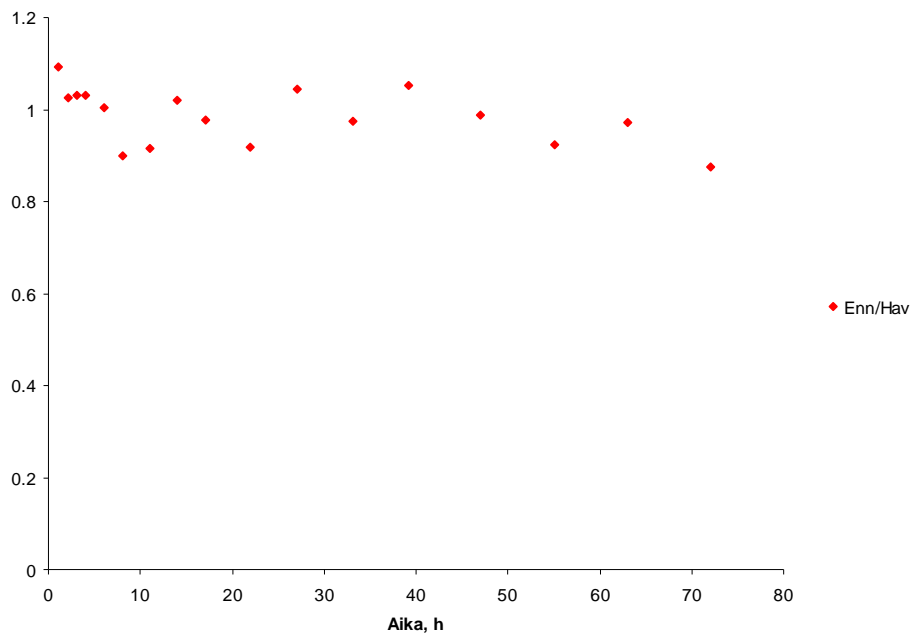
0,21), koska ^{15}N merkätun ammoniumtypen määrä pötsissä oli hyvin pieni neljän tunnin jälkeen SNAN:n pötsiin annostelun jälkeen.



Kuvio 19. Ammoniumtypen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.



Kuvio 20. Pötsin bakteerien ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.



Kuvio 21. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 2.

Bakteeritypen ^{15}N havaittujen ja ennustettujen arvojen suhde pysyi melko vakiona 63 tuntiin asti SNAN:n pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 20). Malli 2 aliarvioi lievästi bakteeritypen ^{15}N -poolikoon huippuarvon, mutta estimoï bakteeritypen metabolian muuten hyvin. Malli 2 estimoï bakteeritypen virtausnopeuden erinomaisesti ($\text{FSD}_{\text{kp_bacteria}} = 0,07$), mutta ei antanut kovin luotettavaa estimaattia bakteeritypen synteesille alkueläintypeksi ($\text{FSD}_{\text{kd_bacteria}} = 0,58$). Myös alkueläintypen ulosvirtauksen FSD-arvo oli suhteellisen suuri ($\text{FSD}_{\text{kp_protozoa_N}} = 0,47$).

Kuten mallissa 1, myös tässä mallissa alkueläintypen metabolian parametrisarvoissa oli enemmän suhteellista hajontaa verrattuna ammoniumtypen tai bakteeritypen metaboliareitteihin. Alkueläinten metaboliaan liittyvät parametrisarvot korreloivat voimakkaasti myös tässä mallissa ja syy tähän oli sama kuin edellisessä mallissa. Koska simulointi mininoi koko mallin residuaaleja, olivat korrelaatiot väistämättä voimakkaita kahden kilpailevan virtausreitän välillä. Liukoiseen NAN-fraktioon ja ammoniumtyppi-fraktioon kohdistuvat parametrisarvojen korrelaatiokertoimet olivat heikkoja, koska molemmissa fraktioissa oli kolme ulosvirtaavaa poolia ja näistä yksi oli vakioitu nesteen ulosvirtausnopeus. Selitykset mallin 2 korkeille FSD-arvoille saattavat olla samoja kuin edellisessäkin mallissa, eli alkueläinten rehupartikkelien ja bakteerien syöntiä ei saatu

pysäytettyä välittömästi näytteenoton jälkeen. Myös mallissa 2 alkueläinten ^{15}N -poolikokoa kuvaavalle käyrälle asetettiin alkuarvo, jonka jälkeen havaitut ja ennustetut arvot saatiin hyvin lähelle toisiaan (kuvio 21). Saattaa olla, että liukoista typpifraktioista syntetisoituneen alkueläintypen metabolia on monimutkaisempaa, kuin malleissa 1 ja 2 on esitetty. Mallin todenmukaisuutta kuvaavien termien (FSD, korrelaatiot) perusteella malli 2 olisi ennemmin ali- kuin yliparametrisoitu malli.

Mallin 2 kaksi mukaan pötsiin annostellusta SNAN:stä 53 % hajosi ammoniumtypeksi. Ammoniumtypen imeytyminen pötsistä oli nopeampaa ($0,667 \text{ h}^{-1}$), kuin ammoniumtypen synteesi mikrobivalkuaiseksi ($0,312 \text{ h}^{-1}$) tai ulosvirtaus pötsistä ($0,224 \text{ h}^{-1}$) nestefaasin mukana. Tällöin 55 % muodostuneesta ammoniumtypestä imeytyi pötsin seinämän läpi, 19 % virtasi ulos pötsistä nestefaasin mukana ja vain 26 % syntetisoitui bakteeritypeksi. Lopulta 29 % säilörehun SNAN:stä imeytyi pötsin seinämän läpi ammoniumtypen muodossa. Tämä oli vain 9 %-yksikköä vähemmän kuin mallissa 1. Vastaavasti nestefaasin mukana poistuneen ammoniumtypen määrä oli 8 %-yksikköä vähemmän kuin mallissa 1. Volden ym. (2002) arvioivat, että 69-85 % SNAN:stä hajosi ammoniumtypeksi pötsissä, mikä on huomattavasti enemmän kuin tässä tutkimuksessa on estimoitu. Tässä tutkimuksessa määritetty nesteen virtausnopeus oli 35 % suurempi ($0,166$ vs. $0,224 \text{ h}^{-1}$), mutta tämä ei välttämättä riitä selittämään koko erotusta. Virtauskinetiikan lisäksi ammoniumtypen muodostumiseen vaikuttavat peptidien ja aminohappojen hajoamisnopeudet sekä bakteerien ottamien aminohappojen ja peptidien hyväksikäyttönopeus. Tähän puolestaan vaikuttaa mm. sellulolyyttisten ja ei-sellulolyyttisten bakteerien suhteelliset osuudet pötsissä. Koska ammoniumtypen imeytyminen ja ulosvirtaus pötsistä oli nopeaa, vain 29 % syntetisoidusta bakteeritypestä oli peräisin ammoniumtypestä ja vastaavasti 71 % aminohapoista ja peptideistä.

Volden ym. (2002) estimoivat nurmisäilörehun ja tuoreen ruohon liukoisten typpifraktioiden kinetiikkaa kahden eri mallin avulla. He annostelivat pötsiin SNAN:ä kolmena eri annoskokona (21, 27 ja 32 mg) ja havaitsivat, että hajoavuusnopeus laski lineaarisesti ($p < 0,05$) kun annostelumäärää lisättiin. Lopullinen malli estimoii pitäketjuisten ja lyhytketjuisten peptidien sekä vapaiden aminohappojen hajoavuusnopeuksiksi 2,30; 2,14 ja $3,34 \text{ h}^{-1}$. Lisäksi he estimoivat, että 11,2 % lyhytketjuisista peptideistä, 7,1 % pitäketjuisista peptideistä ja 5,0 % vapaista aminohapoista virtasi ulos pötsistä hajoamatta. Nämä tulokset tukevat edellisten tutkimusten (Chen ym. 1987) johtopäätöksiä siitä, että lyhytketjuisia

peptidejä kerääntyy pötsiin proteolyysin aikana ja siksi tämä fraktio on myös pötsistä potentiaalisesti ulosvirtaava fraktio.

Liukoisen valkuaistypen osuus pötsissä on pieni ja tämä fraktio on myös suhteessa pienin pötsistä ulosvirtaava fraktio (Hristov ym. 2001). Liukoisen valkuaistypen suhteellisen pieni osuus on selitettävissä sen pienenä osuutena säilörehun kokonaistypestä (Rinne ym. 1997). Tässä tutkimuksessa ei arvioitu erikseen liukoisen valkuaistypen ulosvirtausta. Choi ym. (2002) mukaan noin neljäsosa pötsistä ulosvirtaavasta SNAN:stä oli valkuaistypen muodossa. Hristov ym. (2001) havaitsivat, että suurin pötsistä ulosvirtaava typpifraktio oli ei-valkuais-, ei-ammonium-, ei-mikrobityppipooli (NPAM-N), joka sisälsi pääosin peptidejä ja aminohappoja. Tässä mallissa SNAN virtasi pötsistä ulos nopeudella $0,224 \text{ h}^{-1}$, eli fraktion virtausnopeuden oletettiin olevan sama kuin nesteen virtausnopeus. Tällöin huomattava osa (13 %) SNAN:stä ohitti pötsin hajoamatta. Choi ym. (2002) havaitsivat, että nurmisäilörehua syöville lehmille satakertaan virtaavasta rehuperäisestä NAN:stä noin 5 % oli liukoisessa muodossa. Kun dieettiin lisättiin rypsiä ja ohraa, pötsistä ulosvirtaavan SNAN:n osuus nousi noin 8 % tasolle. Volden ym. (2002) arvioi, vastaaksi osuudeksi 8,5 %, kun lehmät söivät nurmisäilörehua ainoana rehuna. Mallissa 2 mallinnettu SNAN-fraktio edusti säilörehun SNAN-fraktion helpoiten liukenevaa osaa. Osa SNAN-fraktiosta jäi kiinni säilörehun liukenemattomaan osaan ja tästä SNAN-jäännösfraktiosta 16 % ohitti pötsin hajoamatta. Tämä huomioon ottaen koko säilörehun SNAN:stä (mallit 2 ja 3) enemmän kuin 13 % ohitti pötsin hajoamatta. Tässä tutkimuksessa estimoidut tulokset tukevat edellisten tutkimusten johtopäätöksiä siitä, että huomattava osuus SNAN:stä virtaa pötsistä ulos hajoamatta (Choi ym. 2002; Volden ym. 2002).

Säilörehun SNAN:n hyväksikäyttö pötsissä oli ammoniumtypen hyväksikäyttöä tehokkaampaa, sillä yhteensä 62 % SNAN:stä virtasi alempaan ruoansulatuskanavaan joko hajoamatta tai mikrobivalkuaisen muodossa ja oli käytettävissä eläimen maitovalkuaisen synteesiin. Vastaava luku ammoniumtypen osalta oli 44 %. Koska ammoniumtyppi ja SNAN käsittivät yhdessä noin puolet säilörehun typpifraktioista ja koska 38 % ammoniumtipestä (malli 1) ja 29 % SNAN:stä (malli 2) imeytyi pötsin seinämän läpi ammoniumtyypinä, oli tällä metaboliareitillä suurin yksittäinen vaikutus säilörehun valkuaisen hyväksikäyttöön lypsylehmässä. Tällä on myös huomattava vaikutus ympäristön typen kuormitukseen. Useita tutkimuksia on tehty ammoniumtypen hyväksikäytön parantamiseksi pötsissä. Teoreettisesti runsas määrä nopeasti fermentoituvaa liukoista typpeä vaatisi runsaasti nopeasti

fermentoituvia hiilihydraatteja, kuten sokereita (Hristov ym. 2005). Toisaalta nopeasti fermentoituvien hiilihydraattien lisääminen pötsiin laskee pötsin pH -tasoa ja saattaa olla eläimelle haitallista.

Ahvenjärvi ym. (1999 ja 2002) tutkivat typen hyväksikäyttöä, kun nurmisäilörehu -pohjaiseen dieettiin lisättiin ureaa, rypsiä tai ohraa. Urean annostelu pötsiin ei lisännyt satakertaan virtaavan rehuperäisen tai mikrobeista peräisin olevan NAN:n määrää, mutta lisäsi typen erityistä ureaksi. Rypsirouheen ja -puristeen lisääminen joko erikseen tai ohran kanssa lisäsi potentiaalisesti hajoavien aminohappojen määrää pötsissä, mutta ei silti parantanut mikrobivalkuaisen synteesiä eikä lisännyt mikrobeista peräisin olevan NAN:n virtausta satakertaan. Rypsin lisääminen ei myöskään parantanut typen hyväksikäyttöä pötsissä. Nurmisäilörehupohjaisella dieetillä pötsissä on riittävästi aminohappoja ja peptidejä mikrobivalkuaisen synteisiin (Ahvenjärvi ym. 1999; Hristov ym. 2001; Ahvenjärvi ym. 2002; Korhonen ym. 2002). Nykyisten arvioiden perusteella peptidit saattavat käsittää jopa 22 % pötsin kokonaistypen määrästä (Hristov ym. 2001). Koska lyhyt- ja pitkäketjuisten peptidien osuus SNAN:stä on suuri ja koska yli 13 % säilörehun SNAN-fraktiosta voi ohittaa pötsin hajoamatta, on liukoisten typpifraktioiden ja varsinkin peptidien rooli pötsin typpimetaboliassa hyvin merkittävä.

Nopeasti fermentoituvilla hiilihydraateilla tiedetään olevan vaikutusta ammoniumtypen hyväksikäyttöön pötsissä. Ahvenjärvi ym. (2002) havaitsivat, että ohran lisääminen nurmisäilörehu-apila -seokseen lisäsi käytettävissä olevan fermentoituvan energian määrää ja lisäsi myös mikrobiaalisen NAN:n virtausta satakertaan. Koska ohra lisäsi myös pötsin typen hajoavuutta, ohran lisääminen ei vähentänyt typen imeytymistä pötsin seinämän läpi eikä vähentänyt pötsin ammoniumtypen konsentraatiota tai typen erityistä ureaksi (Ahvenjärvi ym. 2002). Hristov ym. (2005) havaitsivat, että glukoosin lisäys sinimailas säilörehupohjaiseen dieettiin vähensi pötsin ammoniumtypen tuotantoa ja ammoniumtypen imeytymistä pötsistä. Puhtaan tärkkelyksen lisäys lisäsi ammoniumtypen synteesiä mikrobivalkuaiseksi. Kauran kuidun lisääminen dieettiin ei parantanut ammoniumtypen hyväksikäyttöä (Hristov ym. 2005), vaikka kuitua hajottavat bakteerit käyttävätkin ammoniumtypeä ainoana typenlähteenään (Russell ym. 1992).

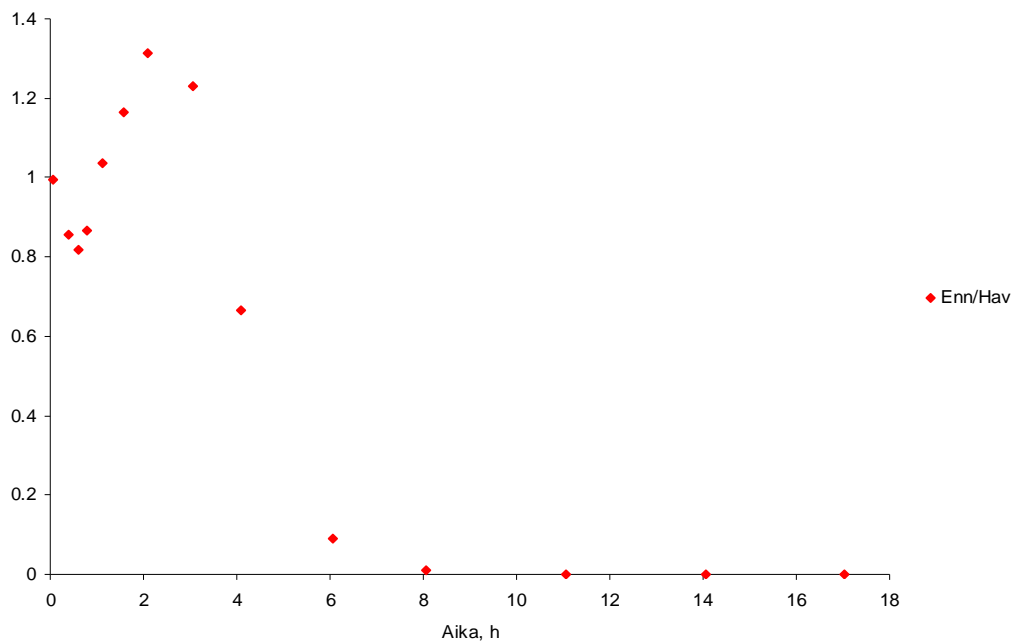
4.3.4 Säilörehun liukenemattoman typen metabolia

Mallissa 3 tarkasteltiin liukenemattoman ja potentiaalisesti hajoavan sekä hajoamattoman valkuaisen metaboloitumista pötsissä. Liukenemattoman typen mallissa potentiaalisesti hajoavan fraktion (IDN) muodostivat fraktiot B₂ ja B₃ ja hajoamattoman fraktion (UN) valkuaisen C-fraktio. Liukoisten typpifraktioiden metaboliaa oli tässä mallissa yksinkertaistettu siten, että ammoniumtyyppi ei syntetisoitunut takaisin bakteeritypeksi. Tämä johtui siitä, että malli 3 estimoi tämän metaboliareitin parametriarvon nollassi. Valmiin parametrisoidun mallin avulla mallinnettiin liukenemattoman typen metaboliaa siten, että SNAN-jäännösfraktion tilamuuttuja asetettiin nollassi. Vastaavasti SNAN-jäännösfraktion simulointi tapahtui asettamalla IDN:n tilamuuttuja nollassi.

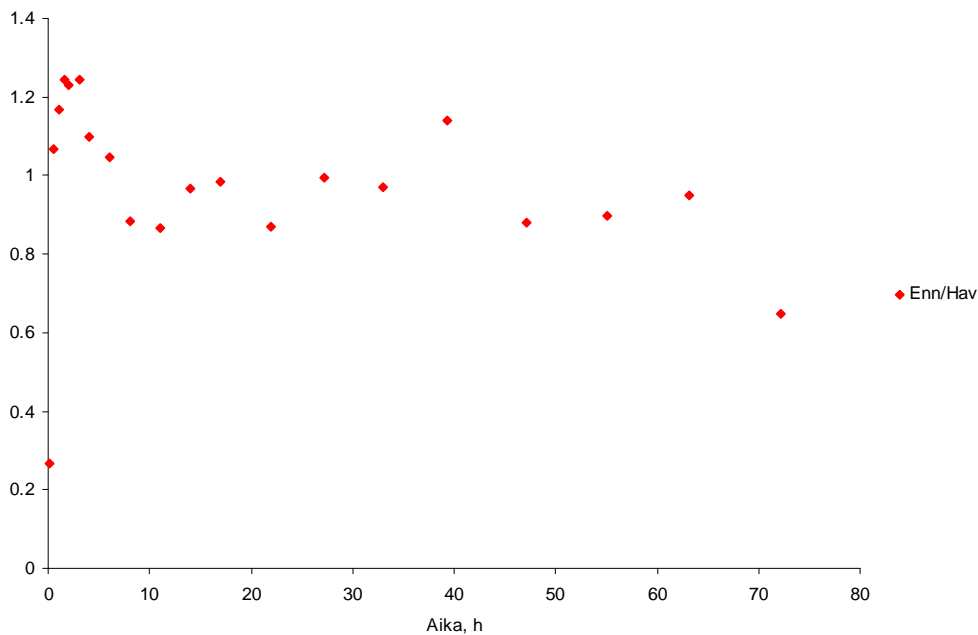
Mallin 3 mukaan pötsissä hajoavasta SNAN:stä 68 % syntetisoitui suoraan bakteeritypeksi ja 32 % hajosi ammoniumtypeksi. Metaboliareittien suhteet olivat päinvastoin kuin mallissa 2, jossa 62 % pötsissä hajoavasta SNAN:stä hajosi ammoniumtypeksi ja 38 % syntetisoitui bakteeritypeksi. Erot eri mallien välillä johtuivat siitä, että liukenemattomaan fraktioon kiinni jäänyt SNAN-jäännösfraktio ei metaboloitunut samalla tavalla, kuin itse SNAN. Liukoisen NAN:n jäännösfraktio saattoi olla tiukemmin kiinni säilörehussa ja hajosi siksi hitaammin. Ammoniumtypen imeytymisnopeus pötsin seinämän läpi (1,077 h⁻¹) saattoi olla yliarvioitu mallissa 3. Tämä saattaa johtua siitä, että todellisuudessa osa ammoniumtypestä syntetisoituisi bakteeritypeksi, vaikka sille ei saatukaan estimaattia. Ammoniumtypen ¹⁵N-poolikoon ennustetut arvot laskivat suhteessa havaittuihin arvoihin jo kahden tunnin jälkeen liukenemattoman typen (+ SNAN-jäännösfraktion) pötsiin annostelun jälkeen (kuvio 22). Malli 3 aliarvio ammoniumtypen ¹⁵N-poolikoon huippuarvon (mg), mutta ennusti ammoniumtypen metabolian muuten hyvin.

Pötsin bakteerien ¹⁵N-poolikokoa kuvaavat määrät vastasivat tilannetta, jossa bakteeripooliin virtasi tyypellisiä yhdisteitä niin SNAN:stä kuin IDN:sta. Bakteeritypen ¹⁵N taustarikastumisen ylittävä määrä (mg) oli siksi suurempi, kuin pelkän liukenemattoman typen malli estimoi. Havaitut ja ennustetut arvot olivat hyvin lähellä toisiaan ajanjaksolla 0-80 tuntia ja malli 3 ennusti melko hyvin bakteeritypen metabolian (kuvio 23). Malli 3 ennusti bakteeritypen ¹⁵N-poolikoon huippuarvon noin 3 tunnin kohdalle vaikka havaittujen arvojen perusteella huippuarvo saavutettiin vasta 8 tunnin kohdalla liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen. Malli 3 estimoi havaitut arvot silti erinomaisesti, sillä vielä 63 tunnin kohdalla

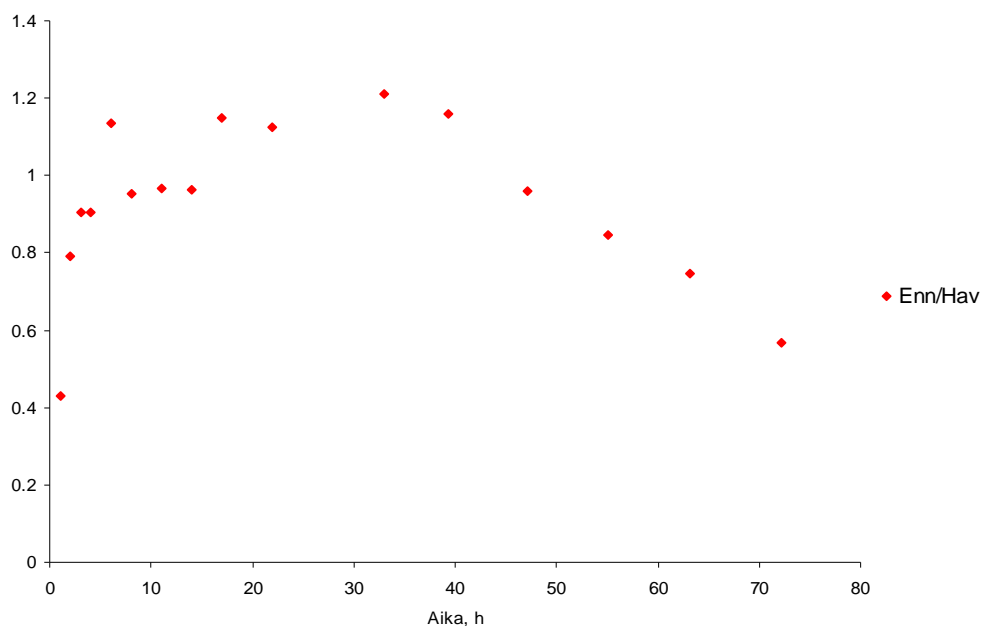
ennustetun ja havaitun arvon suhde on 0,93. Siinä vaiheessa ^{15}N merkatun bakteeritypen määrä pötsissä oli jo hyvin pieni.



Kuvio 22. Ammoniumtypen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.



Kuvio 23. Pötsin bakteerien ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.



Kuvio 24. Pötsin alkueläinten ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.

Mallissa 3 alkueläimet söivät liukenematonta tyyppä hyödyntäviä bakteereita nopeudella $0,030 \text{ h}^{-1}$, joka oli 500 % nopeammin kuin mallissa 2. Koska bakteeritypen ulosvirtausnopeus oli suhteellisen hidasta, merkittävä osa (43 %) muodostuneesta bakteeritypestä siirtyi suoraan alkueläintyypiksi ja vain 57 % virtasi ulos pötsistä bakteeritypen muodossa. Vastaavat luvut mallissa 1 olivat 19 % ja 81 % ja mallissa 2 vastaavasti 14 % ja 86 %. Aikaisempien tutkimusten perusteella on arvioitu, että alkueläimet käyttävät enemmän liukenematonta kuin liukoista valkuaista typen lähteenään (Jouany 1996) ja toisaalta enemmän bakteerityppeä kuin liukenematonta rehutyyppiä (Hristov ja Broderick 1996; Firkins ym. 2007).

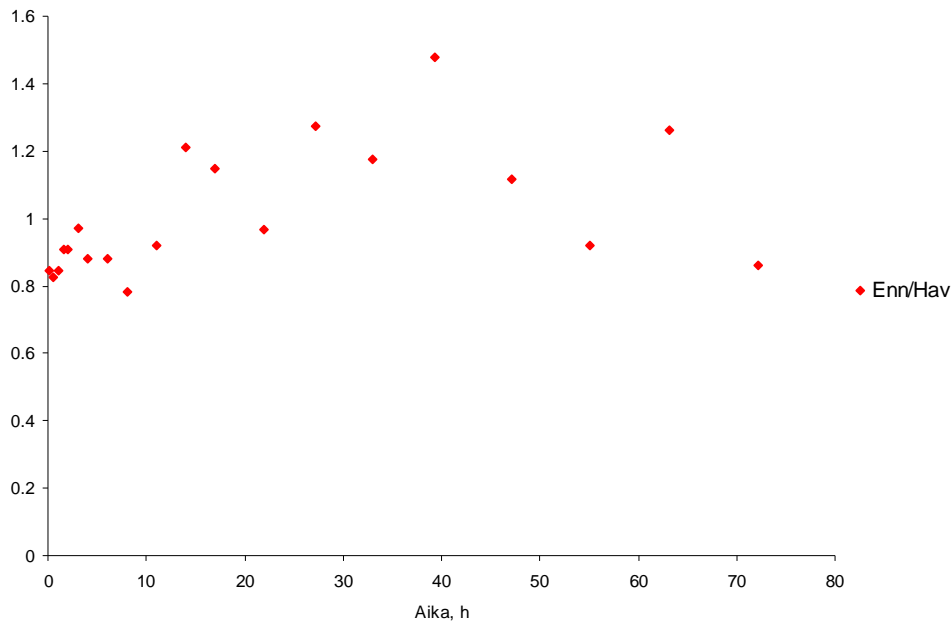
Tässä mallissa alkueläinten ^{15}N -poolikoon muutoksia kuvaavalle käyrälle ei asetettu alkuarvoa ja malli 3 estimoi havaitut arvot silti melko hyvin ajanjaksolla 0-80 tuntia (kuvio 24). Ennustettujen arvojen suhde havaittuihin arvoihin oli vain 0,40 ensimmäisen tunnin kohdalla liukenemattoman typen annostelun jälkeen, mutta ^{15}N merkatun alkueläintypen määrä oli hyvin pieni tässä vaiheessa. Vielä 63 tunnin kohdalla ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde oli 0,75. Alkueläinten ulosvirtausnopeus pötsistä oli huomattavasti suurempi kuin bakteeritypen ($0,085$ vs. $0,040 \text{ h}^{-1}$). Alkueläintypen ulosvirtausnopeus ei välttämättä silti ole yliarvioitu. Esimerkiksi Firkins ym. (2007) totesivat, että alkueläintypen virtausnopeus on

hyvin lähellä pötsin partikkelien virtausnopeutta, mutta kokeissa, joissa kuiva-aineen syönti on ollut runsasta, alkueläintypen ulosvirtaus saattaa olla aliarvioitu.

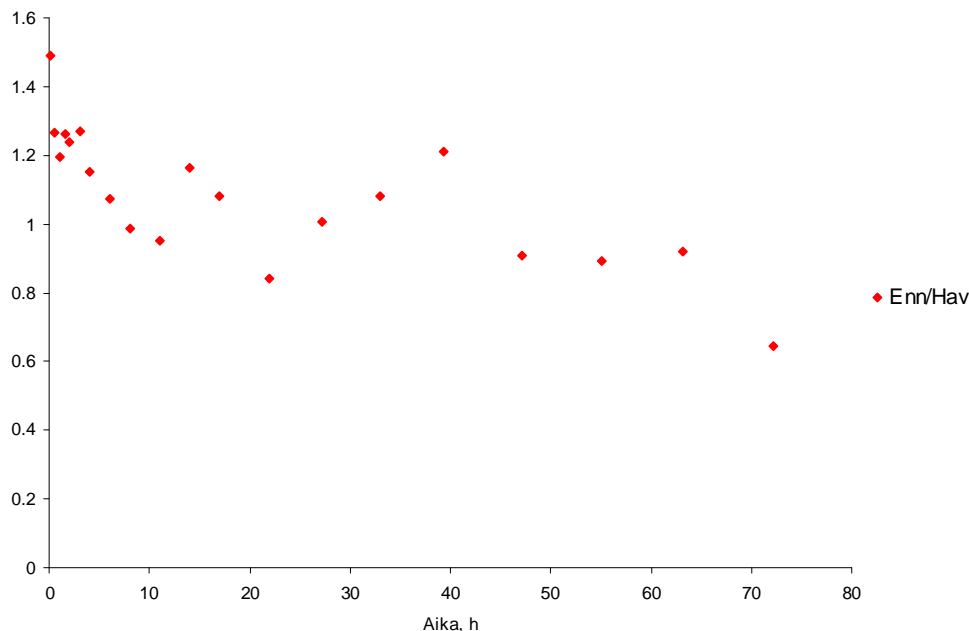
Pötsin liukenematon valkuaistyyppi (liukenematon rehuvalkuainen, bakteerityppi ja alkueläintyyppi) oli suurin pötsistä ulosvirtaava typpipooli. Hristov ym. (2001) totesivat neutraalidetergenttiliuokseen liukenevan partikkelifraktion (rehuvalkuaisen B₂-fraktio, bakteerityppi ja alkueläintyyppi) olevan suurin pötsin typpipooleista ja NPAM -poolin olevan toiseksi suurin, kun lehmät saivat sinimailassäilörehua tai sinimailasheinää ainoana rehuna. Näillä pooleilla on havaittu olevan myös suurimmat typen virtausmäärät (g/h) pötsistä (Hristov ym. 2001). Malli 3 aliarvioi liukenemattoman typen ¹⁵N-poolikoon huippuarvon, mutta estimoii poolikoon pienenemisen melko hyvin (kuvio 25). Myös havaintoaineisto saattoi sisältää virhetekijöitä, sillä liukenematon rehutyyppi ei välttämättä ollut täysin sekoittunut pötsin ruokasulamassaan ajanhetkellä nolla. Saattoi olla, että välittömästi liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen otetut näytteet sisälsivät suhteessa enemmän ¹⁵N merkattua säilörehua kuin pötsin sisältö keskimäärin. Liukenemattoman typen ¹⁵N-poolikoon huippuarvo havaintoaineistossa ajanhetkellä nolla viittaisi tämän virhetekijän mahdollisuuteen. Ennustetut arvot saavuttivat huippuarvonsa vasta 1,5 tunnin kuluttua liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen. Tämä vaikuttaa todenmukaisemmalta, sillä liukenemattoman rehutypen ¹⁵N-poolikoko saavutti huippuarvonsa ajanhetkellä nolla, bakteerityypen ¹⁵N-poolikoko saavutti huippunsa 3 tunnin kohdalla ja alkueläintypen ¹⁵N-poolikoko vasta 14 tunnin kuluttua liukenemattoman typen pötsiin annostelun jälkeen.

Potentiaalisesti hajoavaa, liukenematonta rehuvalkuaista (fraktiot B₂ ja B₃) virtasi pötsistä ulos nopeammin kuin bakteerit ehtivät sitä hyödyntämään mikrobivalkuaisen synteesiin. Tällöin yli puolet (57 %) potentiaalisesti hajoavasta fraktiosta virtasi ulos pötsistä hajoamatta ja vain 43 % syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi. Rehun kuiva-aineen syöntimäärä, pötsin pH sekä nesteen ja partikkelien virtausnopeudet vaikuttavat pötsissä hajoamattoman liukoisen ja liukenemattoman typen ulosvirtaavaan osuuteen. Volden (1999) havaitsi, että ei-ammonium-, ei-bakteerityppeä (NANBN) virtasi ohutsuoleen enemmän korkealla (17,8 kg ka/pv) kuin matalalla (9,2 kg ka/pv) ruokintatasolla. Suhteuttamalla NANBN:n määrä typen saantiin dieetistä (g/pv), suhteellinen NANBN:n virtaus ohutsuoleen oli kuitenkin pienempi suuremmalla ruokintatasolla. Robinson ym. (1985) havaitsivat, että ruokintatasolla ei ole vaikutusta hajoamattoman typen suhteelliseen ulosvirtaavaan määrään. Voldenin (1999) havaitsemat tulokset voidaan selittää sillä, että bakteerityypen tuotanto korreloi positiivisesti

saatavilla olevan orgaanisen aineen määrän kanssa (Clark ym. 1992), jolloin suhteessa vähemmän typpeä virtaa ulos pötsistä hajoamatta. Lisäksi on arvioitu, että kuiva-aineen syönnin ja virtausnopeuden kasvu stimuloivat bakteereita kasvamaan nopeammin (Bach ym. 2005).



Kuvio 25. Liukenemattoman valkuaisen ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.



Kuvio 26. Rehuvalkuaisen C-fraktion ^{15}N rikastuminen yli taustarikastumisen. Ennustettujen ja havaittujen arvojen suhde mallissa 3.

Rehuvalkuaisen C-fraktion oletettiin olevan täysin sulamatonta pötsissä ja virtaavan suoraan pötsistä ulos. Havaittujen arvojen estimaatit yliarvioivat rehuvalkuaisen C-fraktion rikastumisen huippuarvon ajanhetkellä nolla, jolloin ennustetut arvot olivat noin 1,5 kertaisia havaittuihin arvoihin verrattuna (kuvio 26). Saattaa olla, että säilörehun C-fraktio ei ollut täysin sulamatonta pötsissä. Lisäksi pötsistä otettu säilörehunäyte ei välttämättä ollut täysin edustava, koska liukenematon valkuainen sekoittui pötsiin rehumassaan huomattavasti hitaammin kuin esimerkiksi SNAN tai ammoniumsulfaatti. Huolimatta suurista alkuarvoista, malli 3 ennusti hyvin rehuvalkuaisen C-fraktion metaboliaa.

Malli 3 ennusti typen metaboliareiteille erittäin tarkat parametriarvot, sillä suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,04-0,17 koko mallissa. Tässä mallissa myös alkueläinten metabolialle saatiin luotettavat parametriarvot. Parametriarvojen korrelaatiokertoimet olivat heikkoja koko mallissa, joten kerätty havaintoaineisto riitti selittämään mallin 3 kaikki parametriarvot. Koska parametrien FSD-arvot olivat pieniä ja parametriarvojen korrelaatiot heikkoja, malli 3 ennusti luotettavasti ja täsmällisesti liukenemattoman rehutypen metaboliaa pötsissä.

Mallin 3 mukaan 57 % liukenemattomasta rehutypestä virtasi ulos pötsistä hajoamatta. Jos oletetaan, että alkueläimet käsittävät hieman alle puolet pötsin mikrobimassasta (Faichney ym. 1997), hyvin suuri osuus pötsin mikrobitypestä oli peräisin ei-ammoniumtyyppi -lähteistä, eli liukenemattomasta valkuaisesta, aminohapoista ja peptideistä. Tätä päätelmää tukevat Hristov ym. (2001) tutkimuksissa havaitut typen suuret virtausnopeudet NPAM-N poolissa ja ei kuitua sisältävässä partikkelifaasin (käytettävissä oleva rehutyyppi, bakteerityppi ja alkueläintyyppi) poolissa.

4.3.5 Virhetekijät

Dynaamista mallia rakennettaessa on ymmärrettävä, että estimoituja arvoja ei koskaan saa vastaamaan täysin havaittuja arvoja. Kaikki mallit ovat todellisuudessa vääriä. Toiset mallit ovat vain parempia kuin toiset. Kaikkea metaboliaan liittyviä tapahtumia ei voida selittää ja joissakin kohdissa on käytettävä yksinkertaistuksia.

Tässä kokeessa ei otettu huomioon elimistössä tapahtuvaa ureakiertoa. Todellisuudessa osa pötsin seinämän läpi imeytyvästä ammoniumtyypestä siirtyy ureakiertoon, jolloin osa

ammoniumtypestä palaa takaisin pötsiin joko pötsin seinämän läpi tai syljen mukana. Ureakierron mukaanottaminen aiheuttaisi mallin yliparametrisoitumisen, sillä kerätty havaintoaineisto ei riittänyt ureakierron selittämiseen. Ureakierron mallintaminen edellyttäisi ^{15}N -merkkiaineen annostelua verenkiertoon. Hristov ym. (2005) totesivat, että eri väkirehujen lisääminen dieettiin vaikutti virtsan mukana erittyvän typen määrään, mutta ei vaikuttanut pötsin seinämästä takaisin pötsiin imeytyvän ammoniumtypen tai syljen mukana pötsiin kulkevan ammoniumtypen määrään. Molly-mallissa ureakierto on otettu huomioon siten, että ureatyyppi palaa pötsiin ainoastaan syljen mukana. Hanigan ym. (2006) totesivat, että tällä metaboliareitillä on huomattava vaikutus pötsin typpitasapainoon.

Tämän kokeen havaintoaineistossa saattoi olla virhetekijöitä, joiden vuoksi hyväkin malli tuotti suuria residuaaleja havaittujen ja ennustettujen arvojen välille. Esimerkiksi merkkiaineiden annostelu pötsin sisältöön sisälsi virhetekijän mahdollisuuden. Välittömästi näytteiden pötsiin annostelun jälkeen otetut liukenemattoman typen ja rehuvalkuaisen C-fraktion näytteet eivät todennäköisesti olleet täysin edustavia, sillä käsin sekoittaen näytteet eivät välttämättä sekoitu pötsin sisältöön täydellisesti. Sama virhetekijän mahdollisuus oli myös kobolttinäytteissä, vaikka nesteen sekoittaminen pötsin sisältöön olikin helpompaa kuin partikkelifraktion. Harvatine ym. (2002) mallinsivat nesteen virtauskinetiikkaa kahden poolin mallin avulla, sillä he olettivat kobolttin sekoittuvan epätasaisesti pötsin sisältöön.

Myös näytteiden otto sisälsi virhetekijän mahdollisuuden, sillä käytännössä elohopeakloridin lisääminen pötsinäytteeseen (näyte II) näytteenoton jälkeen ei välittömästi pysäyttänyt mikrobialista hajotusta rehussa. Tällöin havaittu bakteeritypen ^{15}N -poolikoko oli hieman todellista arvoa suurempi. Typpifraktioiden ^{15}N -poolikokoa laskettaessa bakteeritypen ennustetuille arvoille ei kuitenkaan tarvinnut asettaa alkuarvoa, toisin kuin alkueläimille alkueläinten ^{15}N -poolikokoa laskettaessa malleissa 1 ja 2. Alkuarvon avulla ennustettu alkueläintypen ^{15}N -poolikokoa kuvaava käyrä saatiin kulkemaan melko hyvin havaittujen arvojen mukaisesti. Alkueläinnäytteiden ongelma oli se, että alkueläimiä ei saatu tapettua välittömästi näytteiden käsittelyn yhteydessä, jolloin on todennäköistä, että osa alkueläimistä ehti syödä rehupartikkeleita ja bakteereita. Lisäksi alkueläinnäytteissä saattoi olla bakteerikontaminaatiota. Malli 3 ennusti alkueläinten metabolian luotettavasti ilman alkuarvoa.

Alkueläinten metabolian estimointi onnistui liukenemattoman typen mallissa paremmin kuin liukoisten typpifraktioiden malleissa. Suurin osa alkueläintyypistä oli peräisin säilörehun liukenemattomasta tyyppistä ja saattaa olla, että liukoisista valkuaisfraktioista muodostunut alkueläinpooli käyttäytyi pötsissä eri tavalla kuin liukenemattomasta valkuaisesta peräisin oleva. Täsmällisempi alkueläinten metabolian estimointi saattaisi tarvita useamman alkueläinpoolin mallin. Tämän kokeen malleissa alkueläimet saivat typellisiä yhdisteitä ainoastaan syömänsä bakteerimassan kautta. Edellisten tutkimusten perusteella on arvioitu, että alkueläimet voivat käyttää myös hajoavaa rehuvalkuaisista typenlähteenään (Firkins ym. 2007). Saattaa olla, että alkueläinten hyödyntämän bakteerityypen ja rehutypen suhde ei ole sama säilörehun liukoisen ja liukenemattoman typen tapauksissa. Walker ym. (2005) totesivat, että alkueläimet söivät ja hajottivat bakteerimassaa vaihtelevalla nopeudella ja että hajotusnopeus oli riippuvainen bakteerisolun seinämän rakenteesta sekä bakteerisolun sisällöstä. Tämä oli puolestaan riippuvainen bakteerilajista ja siitä, millaisia typellisiä tuotteita bakteerit käyttivät hyväkseen.

Shabi ym. (2000) totesivat, että alkueläinten vaikutus ohutsuoleen virtaavan typen määrään on melko pieni pötsissä tapahtuvan alkueläinten valikoivan viipymisajan vuoksi. Heidän johtopäätösten perusteella 11 % ohutsuoleen virtaavasta tyyppistä oli peräisin alkueläimistä. Tämä oli huomattavasti pienempi osuus kuin arvioitu alkueläinten osuus pötsin mikrobimassasta (Faichney ym. 1997; Firkins ym. 2007). Newbold ym. (2005) havaitsivat, että ammoniumtyppi voi liittyä alkueläimiin suoraan glutamaatti-dehydrogenaasin välityksellä. Aikaisempien tutkimusten perusteella (Hristov ym. 2001; Choi ym. 2002) on oletettu, että alkueläimet voivat hyödyntää ammoniumtyppiä ainoastaan syömänsä bakteerimassan kautta. Alkueläinten metaboliaa on tutkittu runsaasti PCR -menetelmällä sekä poistamalla alkueläimet pötsistä, mutta alkueläinten yksityiskohtainen metabolia, alkueläinten yhteys bakteerityypen synteesiin sekä bakteerien ja alkueläinten synergia vaativat vielä tarkempia tutkimuksia (Walker ym. 2005; Firkins ym. 2007).

5. Yhteenveto ja johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ammoniumtypen sekä säilörehun liukoisen- ja liukenemattoman typen metaboloitumista pötsissä sekä kuvata typen jakautumista eri metaboliareitteihin. Koska typen metaboliaa märehtijän elimistössä on tutkittu paljon ja siitä on vakiintuneita käsityksiä, tässä tutkimuksessa keskityttiin metaboliareittien suuruuden arviointiin sekä typen virtausnopeuden estimointiin dynaamisen mallin avulla. Tässä kokeessa WinSAAM -ohjelmistolla rakennetut dynaamiset mallit käsittelivät säilörehun typellisten yhdisteiden suuruutta ja kinetiikkaa pötsin kuudessa eri typpipoolissa: ¹NH₄⁺-N, ²pötsin bakteri-N, ³pötsin alkueläin-N, ⁴säilörehun SNAN, ⁵säilörehun liukenematon ja potentiaalisesti hajoava valkuaisfraktio (B₂ ja B₃) sekä ⁶säilörehun liukenematon ja hajoamaton valkuaisfraktio (C-fraktio).

Ammoniumtypen metabolia pötsissä oli erittäin nopeaa, sillä se imeytyi sellaisenaan pötsin seinämän läpi ja oli toisaalta välittömästi pötsimikrobien käytettävissä mikrobivalkuaisen synteesiin. Ammoniumtyppi siirtyi pötsistä ulos joko ulosvirtauksen tai imeytymisen kautta neljällä eri tavalla. Mallin 1 mukaan 38 % ammoniumtypestä imeytyi suoraan pötsin seinämän läpi, 35 % syntetisoitui bakteritypeksi ja 9 % alkueläintypeksi. Loppuosa (18 %) ammoniumtypestä virtasi nestefaasin mukana satakertaan. Ammoniumtypen hyväksikäyttö pötsissä oli heikkoa, sillä vain 44 % pötsiin annostelusta ammoniumtypestä syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi.

Säilörehun SNAN:n metabolia pötsissä oli nopeaa, sillä aminohapot ja peptidit käsittävät suurimman osuuden tästä fraktiosta. Liukoinen NAN syntetisoitui mikrobivalkuaiseksi kahta eri reittiä. Huomattava osa (38 %) pötsissä hajoavasta SNAN:stä syntetisoitui suoraan mikrobivalkuaiseksi aminohappojen ja peptidien muodossa. Koska osa ammoniumtypestä menetettiin imeytymisen ja ulosvirtauksen kautta, jopa 71 % SNAN:stä syntetisoidusta mikrobivalkuaisesta oli peräisin aminohapoista ja peptideistä ja vain 29 % ammoniumtypestä. Säilörehun SNAN siirtyi pötsistä ulos imeytymisen ja ulosvirtauksen kautta viidellä eri tavalla. Säilörehun SNAN:stä 29 % imeytyi ammoniumtyppenä pötsin seinämän läpi, 10 % virtasi ulos pötsistä ammoniumtypen muodossa, 42 % syntetisoitui bakteritypeksi ja 7 % alkueläintypeksi. Lisäksi 13 % SNAN:stä ohitti pötsin hajoamatta. Säilörehun SNAN:n hyväksikäyttö oli ammoniumtypen hyväksikäyttöä tehokkaampaa, sillä yhteensä 62 %

SNAN:stä virtasi satakertaan sellaisessa muodossa, joka oli potentiaalisesti käytettävissä maitovalkuaisen synteesiin.

Säilörehun liukenematon valkuainen virtasi pötsistä ulos kolmea eri reittiä. Liukenemattoman valkuaisen ulosvirtaus oli nopeampaa kuin hajoavan valkuaisfraktion synteesinopeus bakteeritypeksi ja siksi huomattava osuus potentiaalisesti hajoavista fraktioista B₂ ja B₃ virtasi ulos pötsistä hajoamatta. Lisäksi bakteerityppi virtasi ulos pötsistä hitaammin kuin alkueläintyyppi. Säilörehun liukenemattomasta tyypestä 57 % ohitti pötsin hajoamatta, 24 % syntetisoitui bakteeritypeksi ja 18 % alkueläintyypeksi

Tässä kokeessa rakennetut dynaamiset mallit estimoivat ammoniumtypen metabolian sekä säilörehun valkuaisen ulosvirtauksen ja metabolian ammoniumtypeksi sekä bakteeritypeksi erinomaisesti. Alkueläinten metabolian mallintaminen vaatii yksityiskohtaisempaa tietoa alkueläinten yhteydestä bakteeritypen synteesiin sekä bakteerien ja alkueläinten synergiasta. Liukoisesta valkuaisfraktioista muodostunut alkueläinpooli käyttäytyi pötsissä eri tavalla kuin liukenemattomasta valkuaisesta peräisin oleva. Täsmällisempi alkueläinten metabolian mallintaminen tarvitsee useamman tai monimutkaisemman alkueläinpoolin mallin, kun mallinnetaan säilörehun liukoisten fraktioiden metaboliaa.

Nurmisäilörehuun perustuvalla dieetillä hyvin suuri osuus satakertaan virtaavasta mikrobivalkuaisesta on peräisin ei-ammoniumtyppi -lähteistä, eli liukenemattomasta rehuvalkuaisesta, aminohapoista ja peptideistä. Tässä tutkimuksessa estimoidut tulokset tukevat edellisten tutkimusten johtopäätöksiä siitä, että huomattava osuus SNAN:stä virtaa pötsistä ulos hajoamatta ja että nurmisäilörehupohjaisella dieetillä pötsissä on riittävästi aminohappoja ja peptidejä mikrobivalkuaisen synteesiin. Koska lyhyt- ja pitkäketjuisten peptidien osuus SNAN fraktiosta on suuri ja koska yli 13 % säilörehun SNAN fraktiosta voi ohittaa pötsin hajoamatta, on liukoisten typpifraktioiden ja varsinkin peptidien rooli pötsin typpimetaboliassa hyvin merkittävä.

Kirjallisuus

- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Hristov, A.N. and Huhtanen, P. 2004. Passage kinetics of internal and external markers in lactating dairy cows. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13: 19-22.
- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. and Varvikko, T. 1999. Effects of Supplementation of a Grass Silage and Barley Diet with Urea, Rapeseed Meal and Heat-moisture-treated Rapeseed Cake on Omasal Digesta Flow and Milk Production in Lactating Dairy Cows. *Acta Agriculturae Scandinavica A* 49: 179-189.
- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A. and Huhtanen, P. 2002. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. *Journal of Animal Science* 80: 2176-2187.
- Allen, M.S. and Mertens, D.R. 1988. Evaluation constraints of fibre digestion by rumen microbes. *Journal of Nutrition* 118: 261-270.
- Allen, M.S. and Miller, E.L. 2005. Ammonia requirements for maximum synthesis of microbial protein. In: *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle*. (Pfeffer, E and Hristov, A., ed.), 17-20. CABI Publishing, Cambridge, USA. 288p.
- Artturi 2007. URL = https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalyysin_tulkinta_marehtijat. Viitattu 9.10.2007.
- Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88: E9-E21.
- Chen, G., Russell, J.B. and Sniffen, C.J. 1987. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *Journal of Dairy Science* 70: 1211-1219.
- Choi, C.W., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Toivonen, V. and Huhtanen, P. 2002. Quantitation of the flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasal canal of dairy cows fed grass silage based diets. *Animal Feed Science and Technology* 96: 203-220.
- Clark, J.H., Klusmeyer, T.H. and Cameron, M.R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogenous fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 75: 2304-2323.
- Danfær, A., Huhtanen, P., Udén, J., Sveinbjörsson, J. and Volden, H. 2006. Karoline – a Nordic cow model for feed evaluation. Model description. In: *Ruminant Physiology* (Serjssen, K., Hvelplund, T and Nielsen, M.O., ed.), 87-126. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 600p.
- Faichney, G.J., Poncet, C., Lassalas, B., Jouany, J.P., Millet, L., Doré, J. and Brownlee, A.G. 1997. Effect of concentrates in hay diet on the contribution of anaerobic fungi, protozoa and bacteria to nitrogen in rumen and duodenum digesta in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 64: 193-213.
- Firkins, J.L., Berger, L.L., Merchen, N.R., Fahey, Jr. G.C. and Mulvaney, R.L. 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *Journal of Dairy Science* 70: 2302-2311.
- Firkins, J.L., Yu, Z. and Morrison, M. 2007. Ruminal nitrogen metabolism: Perspectives for interaction of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of Dairy Science* 90: E1-E16.
- Givens, D.I. and Rulquin, H. 2004. Utilization by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 114: 1-18.

- Graig, W.M., Broderick, G.A. and Ricker, D.B. 1987. Quantitation of Microorganisms Associated with the Particulate Phase of Ruminal Ingesta. *The Journal of Nutrition* 117: 56-62.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications) Agricultural Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Hanigan, M.D., Bateman, H.G., Fadel, J.G. and McNamara, J.P. 2006. Metabolic model of ruminant metabolism: Recent improvements and current status. *Journal of Dairy Science* 89: E52-E64.
- Harvatiné, D.I., Winkler, J.E., Devant-Guille, M., Firkins, J.L., St-Pierre, N.R. and Eastridge, M.L. 2002. Whole linted cottonseed as a forage substitute: Fiber effectiveness and digestion kinetics. *Journal of Dairy Science* 85: 1988-1999.
- Hristov, A.N. and Broderick, G.A., 1996. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay or corn silage. *Journal of Dairy Science* 79: 1627-1637.
- Hristov, A.N., Huhtanen, P., Rode, L.M., Acharya, S.N. and McAllister, T.A. 2001. Comparison of the ruminal metabolism of nitrogen from ¹⁵N-labeled alfalfa preserved as hay or as silage. *Journal of Dairy Science* 84: 2738-2750.
- Hristov, A.N., Ropp, J.K., Grandeen, K.L., Abedi, S., Etter, R.P., Melgar, A. and Foley, A.E. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 83: 408-421.
- Huhtanen, P. 1992. The effects of barley vs. barley fibre with or without distiller's soluble on site and extent of nutrient digestion in cattle fed grass-silage-based diet. *Animal Feed Science and Technology* 36: 319-337.
- Huhtanen, P. and Hristov A.N. 2001. Estimating passage kinetics using fibre-bound ¹⁵N as an internal marker. *Animal Feed Science and Technology* 94: 29-41.
- Huhtanen, P. and Jaakkola, S. 1992. The effects of the forage preservation method and the proportion of concentrate on digestion and of cell wall carbohydrates and rumen digesta pool size in cattle. *Grass Forage Science* 48: 155-165.
- Hume, I.D., Moir, R.J. and Somers, M. 2005. Ammonia requirements for maximum synthesis of microbial protein. In: *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle*. (Pfeffer, E and Hristov, A., ed.), 17-20. CABI Publishing, Cambridge, USA. 288p.
- Jaakkola, S. and Huhtanen, P. 1992. The effects of the forage preservation method and the proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. *Grass Forage Science* 48: 146-154.
- Jouany, J-P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *The Journal of Nutrition* 126: 1335S-1346S.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. and Huhtanen, P. 2002. Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *Journal of Dairy Science* 85: 3336-3351.
- Krishnamoorthy, U.C., Sniffen, C.J., Stern, M.D. and Van Soest, P.J. 1983. Evaluation of mathematical model of digesta and in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen undegraded nitrogen content of feedstuff. *British Journal of Nutrition* 50: 555-568.
- Licitra, G., Hernandez, T.M. and Van Soest, P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology* 57: 347-358.
- McCullough 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297-304.

- Madsen, J. 1985. The basis for the proposed Nordic protein evaluation system for ruminants. The AAT-PBV system. *Acta Agriculturae Scandinavica Supplement* 25: 9-20.
- Morrison, M. and Mackie, R.J., 1996. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understandings and future perspectives. *Australian Journal of Agricultural Research* 47: 227-246.
- MTT 2006. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset 2006. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Jokioinen. MTT:n selvityksiä 106. 84 s.
- Newbold, C.J., McEwan, N.R., Calsa, R.E., Chareyron, E.N., Duval, S.M., Eschenlauer, S.C.P., McIntosh, F.M., Nelson, N., Travis, A.J. and Wallace, R.J. 2005. In: Firkins, J.L., Yu, Z. and Morrison, M. 2007. Ruminal nitrogen metabolism: Perspectives for interaction of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of Dairy Science* 90: E1-E16.
- Okorie, A.U., Buttery, P.J. and Lewis, D. 2005. Ammonia requirements for maximum synthesis of microbial protein. In: *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle*. (Pfeffer, E and Hristov, A., ed.), 17-20. CABI Publishing, Cambridge, USA. 288p.
- Pichard, G. and Van Soest, P.J. 1977. Protein solubility of ruminant feeds. *Proceeding Cornell Nutrition Conference*. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY, 91-98.
- Rinne, M.M., Jaakkola, S. and Huhtanen, P. 1997. Grass maturity effects on cattle fed grass silage-based diets. 1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science and Technology* 67: 1-17.
- Robinson, P.H., Sniffen, C.J. and Van Soest, P.J. 1985. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the forestomachs of dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 65: 437-444.
- Roe, M.B. and Sniffen, C.J. 1994. Nitrogen components of forages and feedstuffs. In: *Principles of Protein Metabolism in Ruminants*. (Asplund, J.M., ed.), 43-70. CRC Press, Florida, USA. 218p.
- Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., Van Soest, P.J. and Sniffen, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 70: 3551-3561.
- Satter, L.D. and Slyter, L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vivo. *British Journal of Nutrition* 32:199-208.
- Seo, S., Lanzas, C., Tedeschi, L.O. and Fox, D.G. 2007. Development of a mechanistic model to represent the dynamics of liquid flow out of the rumen and to predict the rate of passage of liquid in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 840-855.
- Shabi, Z., Tagari, H., Murphy, M.R., Bruckental, I., Mabjeesh, S. J., Zamwel, S., Celik, K. and Arieli, A. 2000. Partitioning of amino acids flowing to the abomasum into feed, bacterial, protozoal, and endogenous fractions. *Journal of Dairy Science* 83: 2326-2334.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G. and Russell, J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* 70: 3562-3577.
- Stern, M.D., Varga, G.A., Clark, J.H., Firkins, J.L., Huber, J.T. and Palmquist, D.L. 1994. Symposium: Metabolic relationship in supply of nutrients for milk protein synthesis. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 77: 2762-2786.

- Tamminga, S., Robinson, P.H., Vogt, M. and Boer, H. 1989. Rumen ingesta kinetics of cell wall components in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 25: 89-98.
- Teeter, R.G. and Owens, F.N. 1983. Characteristics of water soluble markers for measuring rumen liquid volume and dilution rate. *Journal of Animal Science* 56: 717-728.
- Tuori, M., Kaustell, K.V. and Huhtanen, P. 1998. Comparison of the protein evaluation systems of feeds for dairy cows. *Livestock Production Science* 55: 33-46.
- Udén, P., Colucci, P.E. and Van Soest, P.J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal of Science of Food and Agriculture* 31: 625-632.
- Van Soest, P.J., Sniffen, C.J., Mertens, D.R., Fox, G.D., Robinson, P.H. and Krishnamoorthy, U.C. 1981. A net protein system for cattle. The rumen submodel for nitrogen. In: F.N. Owens (Ed.) *Protein Requirements for Cattle: Proceedings of an International Symposium*. MP 109. p. 285. Div. of Agric., Oklahoma State University, Stillwater.
- Volden, H. 1999. Effect of level of feeding and ruminally undegraded protein on ruminal bacterial protein synthesis, escape of dietary protein, intestinal amino acid profile, and performance of dairy cows. *Journal of Animal Science* 77: 1905-1918.
- Volden, H., Mydland, L.T. and Olaisen V. 2002. Apparent ruminal degradation and rumen escape of soluble nitrogen fractions in grass silage administered intraruminally to lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 80: 2704-2716.
- Walker, N.D., Newbold, C.J. and Wallace, R.J. 2005. Nitrogen metabolism in rumen. In: *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle* (Pfeffer, E and Hristov, A., ed.), 71-115. CABI Publishing, Cambridge, USA. 288p.
- Wallace, R.J. 1996. Ruminal Microbial Metabolism of peptides and Amino Acids. *The Journal of Nutrition* 126: 1326S-1334S.
- Wastney, M.E., Patterson, B.H., Linares, O.A., Greif, P.C. and Boston, R.C. 1993. *Investigating Biological Systems Using Modeling*. Academic Press. A Division of Harcourt Brace and Company, San Diego, California, USA. 381 p.